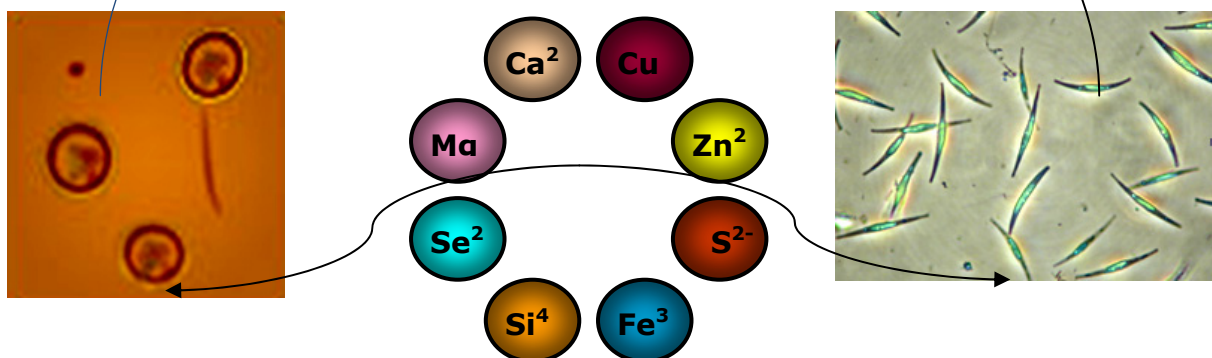


Modificación de la transferencia de nutrientes

en la cadena nutritiva microalga-rotífero y microalga-Artemia
mediante cambios en la formulación de los nutrientes en el cultivo microalgal





Laboratorio de Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Santiago

Modificación de la transferencia de nutrientes

**en la cadena nutritiva microalga-rotífero y microalga-Artemia
mediante cambios en la formulación de los nutrientes en el cultivo microalgal**

Memoria que para optar
al Grado de Doctor en Biología Marina y Acuicultura presenta
José Angel Ronsón Paulín

Santiago de Compostela, Septiembre de 2010



Laboratorio de Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Santiago

Jaime A. Fábregas Casal, Catedrático, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela,

HACE CONSTAR

Que la memoria titulada **“Modificación de la transferencia de nutrientes en la cadena nutritiva microalga-rotífero y microalga-Artemia, mediante cambios en la formulación de los nutrientes en el cultivo microalgal.”** que presenta D. José Angel Ronsón Paulín para optar al Grado de Doctor en Biología Marina y Acuicultura, fue realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Parasitología y autorizamos su presentación.

Y para que así conste, se firma en Santiago de Compostela a de de 2010.

Prof. Dr. Jaime Fábregas Casal

*A la memoria de mi abuela
Ma. Concepción Ibarra Alamilla*

Agradecimientos

Al Prof. Dr. Jaime Fábregas Casal tutor, mentor y amigo, no creo tener las palabras precisas para agradecer su invaluable apoyo en todos los sentidos, primeramente por haberme aceptado en su laboratorio y el honor de pertenecer a su grupo de investigación. Recuerdo a mí llegada tus regaños y ceños de incertidumbre ante mi indominia, los cuales aquilate día con día, me hicieron evolucionar, crecer como persona y progresar científicamente, demostrando en varios coloquios en el mundo lo bien aprendido.

A la Profa. Dra. Ana Otero Casal por su tiempo invertido en mí y sus llamadas de atención las cuales fueron por demás invaluable, en mi formación científica. Dra. Ana Otero, gracias mil, pues me enseñasteis el verdadero valor del rigor científico y ético, espero no defraudarte.

A mí querida madre *María Cecilia*, por haber confiado en mis manos el honor y título de hijo, mil gracias por enseñarme el real y verdadero camino de las cosas, a incitarme a levantarme, cuando he tenido la necesidad de hacerlo y a no desfallecer cuando casi no ha quedado nada. A mis hermanos Ma. Cecilia y Adalberto, así como a mis sobrinos Alejandro, Benjamín, Leonardo, Juan Carlos y Santiago, y por que no....a ti también viejo.

A miña familia galega (Sandra, Gerardo's, a Avoa), especialmente para ti Maria de Xesús (*Chus*) que aprendeu a respectar como unha segunda nai, e que grazas a vostedes nunca me sentín lonxe de casa e cando teña que soporte sempre estivo alí ... grazas.

Durante a miña estadía en Europa, pero sobre todo en España, en Santiago, eu tive a gran sorte de atopar compañeiros e amigos de valor inestimable, que me fixo sentir como un galego máis e que eu nunca vou esquecer: Martinha, Paula, Susana, Sônia, Ana Maceda, Bonastre, Noemi, Rubén, Manuelito, Pedro, Chus, Iván, Benito, Alberto Luna, hai máis, nin sequera alude a eles, só afirmar a todos.....eu levo no meu corazón.

Desejo também dedicar umas palavras muito especiais a minhas doces mulheres de ébano, *Maria Cristina* e *Deise Vanessa* levo-as em meu coração, vossa existência alumiu e deu beleza a esta etapa de minha vida, obrigado Cristina por

compartilhar comigo momentos felizes e me ensinar dos maus a ressurgir, os quais bem valeram apena, e sem os qual não sería a pessoa que sou agora. Como tudo na vida assim se aprende ao crescer e lutar por aquilo no que cremos obrigado onde queira que estejam.

A mis amigos nacionales.... personas férreas.....a las cuales doy gracias por su confianza y consejos insustituibles; las cuales hicieron más llevadero mi retorno Luis, José María, Celso, Lulú, Eduardo, Lucila, Gelia.

Mi llegada a Santiago de Compostela fue el comienzo de esta gran aventura interoceánica y Científico-Técnica en la que me monte, con unos deseos enormes por aprender y pulir mis deficiencias, fue largo el trayecto emprendido pero ahora que lo he concluido no quepo de gozó y deseo manifestar mis gracias:

A la Dra. María Teresa Dinis catedrática del Centro de Ciências do Mar (CCMAR), Campus de Gambelas, de la Universidade do Algarve, Portugal, por la oportunidad y las facilidades para continuar con mi perfeccionamiento científico en sus laboratorios.

A las Dras. Ángeles Cid Blanco y Carmen Rioobo Blanco pertenecientes al Área de Microbiología del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidade Da Coruña por su apoyo en el procesamiento y análisis de muestras por Citometría de Flujo.

A la Dra. María José Núñez García catedrática y María Jerez Longueira del Departamento de Ingeniería Química de la Universidade Santiago de Compostela, por su apoyo para el análisis de Actividad Antioxidante y Contenido Polifenólico Total celular.

Al Dr. Oscar García Martín jefe del programa de Posgrado en Biología Marina y Acuicultura y en su momento jefe del Instituto de Acuicultura de la Universidade de Santiago de Compostela por su apoyo moral y económico.

Al programa de mejoramiento Del profesorado:

Ronsón-Paulín José Angel, ha sido Becario Doctoral de Estudios de Posgrado de Alta Calidad del **Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP-SEP)** en el periodo 2002-2006 (PROMEP/Folio UMAR3/2002).



Esta tesis doctoral ha sido financiada por el proyecto de investigación

*Sorte é o que sucede quando
a preparação é a oportunidade
se encontram e fusionam.*

Voltaire

No. pag

Introducción

Generalidades	1-2
Papel de las microalgas en el océano y como base de la cadena trófica	2-3
Composición Bioquímica Microalgal	
Proteínas, carbohidratos y lípidos	4
Vitaminas en microalgas	4
Esteroles en microalgas	5
Ácidos grasos en microalgas	5
Clasificación de ácidos grasos	5-6
Pigmentos en microalgas	7-8
Las microalgas como fuente de alimentación y modificación bioquímica de la cadena trófica	8
Nutrición mineral como fuente de modificación bioquímica de la cadena trófica	8-13
Técnicas de producción microalgal	
Cultivo en "Batch"	13
Cultivo continuo	14
Cultivo Semi-continuo	14-15
Cultivo Fed-batch	15

Objetivos

Objetivo general	18
Objetivos particulares	18-19

Materiales y métodos

Sistema de cultivo microalgal	22-24
Sistema de cultivo <i>Brachiouonus plicatilis</i>	24
Sistema de cultivo <i>Artemia franciscana</i>	24-25
Métodos de Evaluación de la Biomasa Microalgal y obtención de Biomasa de Zooplancton (Rotíferos y Artemia)	
Recuento y cosecha celular	25-26
Recuento y cosecha microorganismos	26
Cálculo de la tasa o índice de crecimiento en rotíferos	26
Determinación tasa de conversión alimenticia y eficiencia crecimiento en <i>Artemia</i> y rotífero	26
Determinación de nitrato en el medio de cultivo	27

Determinación del peso seco y cenizas de las células, rotífero y <i>Artemia</i>	27
Análisis elemental celular (C-H-N)	27
Técnicas analíticas	
Determinación del contenido de proteínas (método Lowry <i>et al.</i> , 1951) en biomasa celular y organismos (rotíferos y <i>Artemia</i>)	28
Análisis del contenido lipídico (Marsh and Weinstein, 1966), en biomasa celular y organismos (rotíferos y <i>Artemia</i>)	29-30
Análisis del contenido de carbohidratos, en biomasa celular y organismos (rotíferos y <i>Artemia</i>)	31
Cálculo del valor calórico de la biomasa celular y organismos (rotífero y <i>Artemia</i>)	31
Análisis del contenido de ácidos grasos de la biomasa celular y organismos (rotífero y <i>Artemia</i>)	32
Análisis de la absorción de metales en la biomasa celular y organismos (rotífero y <i>Artemia</i>)	33
Análisis de la capacidad antioxidante y contenido polifenólico total	34
Análisis del tamaño celular (FSC), complejidad celular o granularidad (SSC) y autofluorescencia (<i>Cla</i>), por citometría de flujo	35-36
Análisis estadístico de los datos	36

Descripción de las especies utilizadas

<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (Bohlin)	39-40
<i>Isochrysis galbana</i> (var. T-iso)	40-41
<i>Brachionus plicatilis</i> O. F. Müller	42-44
<i>Artemia franciscana</i> (Kellogg, 1906)	44-46

Capítulo 1. Estudio de la incorporación y efecto unitario de los elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en diferentes concentraciones en el medio de cultivo "ALGAL" (Fábregas *et al.*, 1984), sobre la generación de biomasa y composición bioquímica de ***Phaeodactylum tricornutum*(Bohlin)** en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.

Introducción	49
Diseño experimental	49
Resultados y discusión	50-91

Capítulo 2. Estudio de la incorporación y efecto unitario de los elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en diferentes concentraciones en el medio de cultivo "ALGAL" (Fábregas *et al.*, 1984), sobre la generación de biomasa y composición bioquímica de *Isochrysis galbana* var **T-iso** en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.

Introducción	94
Diseño experimental	94
Resultados y discusión	95-141

Capítulo 3. Evaluación poblacional, modificación bioquímica e incorporación de elementos unitarios por *Artemia franciscana* y *Brachionus plicatilis*, ocasionada por el enriquecimiento en cultivo con *Phaeodactylum tricornutum*, cultivada en sistema semicontinuo, con una tasa de renovación del 30% y concentración óptima de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} .

Introducción	144
Diseño experimental	144-146
Resultados y discusión	146-182

Capítulo 4. Evaluación poblacional, modificación bioquímica e incorporación de elementos unitarios por *Artemia franciscana* y *Brachionus plicatilis*, ocasionada por el enriquecimiento en cultivo con *Isochrysis galbana* var **T-iso**, cultivada en sistema semicontinuo, con una tasa de renovación del 30% y concentración óptima de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} .

Introducción	185
Diseño experimental	185-187
Resultados y discusión	187-227

Capítulo 5. Reformulación del **Medio de Cultivo "ALGAL"** (Fábregas *et al.*, 1984) por la incorporación en conjunto de los elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en concentraciones óptimas; en dos tipos de medio: **Algal Alto Rendimiento (AARPt, AARTISO)** y **Algal Incremento Concentración EPA y DHA (AEPA y ADHA)** para *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. **T-iso** respectivamente.

Introducción	230
Diseño experimental	231
Resultados y discusión	231-240

Capítulo 6. Evaluación del efecto de los medios de cultivo **Algal Alto Rendimiento (AAR)** y **Algal Incremento Concentración DHA (ADHA)** en diferente concentración de nitrógeno, sobre la generación de biomasa, composición bioquímica, e incorporación elemental de ***Isochrysis galbana* var. T-iso**, en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.

Introducción	243
Diseño experimental	243
Resultados y discusión	244-267

Capítulo 7. Evaluación del efecto de los medios de cultivo **Algal Alto Rendimiento (AAR)** y **Algal Incremento Concentración EPA (AEPA)** en diferentes concentraciones de nitrógeno, sobre la generación de biomasa, composición bioquímica, e incorporación elemental de ***Phaeodactylum tricornutum***, en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.

Introducción	270
Diseño experimental	270
Resultados y discusión	271-294

Capítulo 8. Estudio poblacional, modificación bioquímica e incorporación de elementos por ***Artemia franciscana* y *Brachionus plicatilis***, ocasionada por el enriquecimiento, con los medios de cultivo **AARPt y AEPA** en ***Phaeodactylum tricornutum***, cultivada en sistema semicontinuo, con una tasa de renovación del 30%.

Diseño experimental	297-298
Resultados y discusión	298-343

Capítulo 9. Estudio poblacional, modificación bioquímica e incorporación de elementos por ***Artemia franciscana* y *Brachionus plicatilis***, ocasionada por el enriquecimiento, con los medios de cultivo **AARTISO y ADHA** en ***Isochrysis galbana* var. T-iso**, cultivada en sistema semicontinuo, con una tasa de renovación del 30%.

Diseño experimental	346-347
Resultados y discusión	347-396

Capítulo 10. Evaluación de la **Capacidad Antioxidante** (AA) y **Contenido Polifenólico Total** (CPT), en las microalgas ***Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. T-iso**, manipuladas bioquímicamente con los medios de cultivo ***Algal Alto Rendimiento (AARPt, AARTISO)* y *Algal Incremento Concentración EPA y DHA***.

Introducción	399-400
Diseño experimental	400-401
Resultados y discusión	401-415

Capítulo 11. Estudio del **Tamaño Celular** (FSC), **Complejidad Celular o Granularidad** (SSC) y **Autofluorescencia** (Cla), por Citometría de Flujo, en las microalgas ***Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var T-iso**, manipuladas bioquímicamente con los medios de cultivo ***Algal Alto Rendimiento (AARPt, AARTISO)* y *Algal Incremento Concentración EPA y DHA***.

Introducción	418-419
Diseño experimental	419
Resultados y discusión	419-435

Resultados	436-441
Conclusiones	442-444
Resumen	445-450
Abstract	451-468
Referencias	479-526

Introducción

Generalidades

La acuicultura se está desarrollando, expandiendo e intensificando en casi todas las regiones del mundo. La demanda de la población global por productos alimentarios acuáticos esta aumentando. Dado el crecimiento poblacional para las próximas dos décadas se estima que en el 2030 serán necesarias 40 millones de toneladas de productos del mar para mantener el actual consumo per cápita. La producción por pesquerías de captura se ha nivelado y la mayoría de las principales áreas de pesca han alcanzado su potencial máximo (FAO, 2007). Por lo tanto el abastecimiento sostenido de pescado desde las pesquerías de captura no será capaz de satisfacer la creciente demanda global por alimentos acuáticos. Según la FAO en 2006 la pesca y acuicultura a nivel mundial suministro 110 millones de toneladas de organismos acuáticos para consumo humano, 16.7 per cápita (valor histórico mas alto); de este total la acuicultura represento el 47% (FAO, 2007, 2009). En general las pesquerías proveen entre 15 y 18.5% de proteína animal de 2,9 billones de personas. El suministro de alimentos per cápita por acuicultura ha incrementado de 0,7 kg en 1970 a 7,8 kg en 2006 a una tasa media de crecimiento anual del 6,9%.

La acuicultura parece tener el potencial de hacer una contribución considerable a esta creciente demanda por alimentos; sin embargo para alcanzar esto el sector acuícola enfrenta importantes desafíos (FAO, 2009).

La acuicultura se define, según la FAO, como el cultivo de organismos acuáticos peces, crustáceos, moluscos y plantas acuáticas. Tal actividad se ha constituido, además en una de las acciones productivas humanas más innovadoras durante las últimas décadas del siglo XX.

La idea de cultivar las aguas continentales y marinas no es nueva; en Hawai se descubrieron vestigios de estanques utilizados para la estabulación o mantenimiento que datan de tiempos prehistóricos. La acuicultura como actividad productiva, posee una larga historia, de más de 2000 años, habiéndose iniciado en China alrededor del 475 AC (Milne, 1972). De manera empírica por observación de organismos acuáticos y técnicas de pesca arcaicas es como se establecieron las primeras formas de cultivo. En Japón desde 745 DC ya se tenían experiencias sobre el cultivo de moluscos bivalvos.

Experiencias sobre cría de peces, moluscos y crustáceos se iniciaron en el siglo XIX pero en ningún caso se logro controlar el ciclo biológico. Se realizaron siembras masivas de huevos o primeros estadios larvarios en el mar, apogeo que en los 50s ceso sin constatar efecto alguno sobre las poblaciones naturales (Shelbourne, 1968, Purdom *et al*; 1972, Bengtson in Stottrup and McEvoy, 2003). Es en las décadas de los 60s y 70s que nuevamente adquiere atención la acuicultura de especies marinas ante el desplome de las pesquerías; desde el punto de vista científico y tecnológico. Pero existía aun la incertidumbre de no poder controlar las primeras etapas del desarrollo larval de organismos debido a la cantidad y calidad del alimento vivo principal cuello de botella en la acuicultura industrial. Importante destacar que es gracias al empleo de *Artemia* que desde 1920s algunos investigadores pudieron completar a nivel de laboratorio; ciclos de desarrollo larval de peces planos como el lenguado y platija (Hoff and Snell 1999) y de otros peces marinos como *Pagrus major* en los 60s con la ayuda del rotífero *Brachionus plicatilis* (Seto Marine Biology

Laboratory, 1966). La producción de juveniles de moluscos y crustáceos progreso; donde parte de los problemas de nutrición larvaria se resolvieron con la puesta a punto de técnicas de cultivo microalgal (Hirata, 1979).

El cultivo de organismos acuáticos es un sector industrial emergente que requiere de grandes esfuerzos encaminados a la investigación y desarrollo tecnológico.

La importancia de un enfoque multidisciplinario en la investigación para el avance de la acuicultura, redundando en un desarrollo integrado del conocimiento desde diferentes aspectos de la biología de los organismos que se pretenden cultivar, como son la fisiología, reproducción, genética, patología y nutrición.

La acuicultura moderna provee de medios efectivos para la producción intensiva de organismos acuáticos bajo condiciones controladas, Tal industria con inversión y ganancias multimillonarias crece rápidamente (Sorgeloos *et al*; 2001), sin embargo, su expansión ha experimentado problemas severos desde etológicos, como nutricionales. Aun cuando grande ha sido el progreso, la identificación de los requisitos dietarios de los estadios larvales de muchas especies en acuicultura es aún incierta y poco controlable. La Biotecnología microalgal se plantea como una herramienta de manipulación de la cadena trófica en beneficio de la industria del larvicultivo.

Papel de las microalgas en el océano y como base de la cadena trófica.

El fitoplancton oceánico, con una producción de varios cientos de billones de toneladas de peso seco por año, forma la base de la cadena alimentaria acuática, lo que contribuye a la producción de unos 100 millones de toneladas de recursos renovables al año por pesca. Por lo tanto, no es de extrañar que las microalgas componentes del fitoplancton jueguen un papel crucial en la nutrición de los organismos marinos, especialmente para los moluscos, crustáceos y peces. En los laboratorios de desarrollo larval es necesario incluyan un sistema de producción de microalgas, y, en el caso de larvas de peces marinos, un sistema de producción de presas vivas (Muller-Feuga, *et al*; 2003).

Las microalgas son microorganismos eucariotas capaces de transformar la energía solar en biomasa con una eficacia entre 2 y 5 veces superior a las plantas superiores (Thomas *et al.*, 1984). Las microalgas y cianobacterias son un componente importante del reino vegetal, y juegan un papel importante en la construcción y el mantenimiento de la atmósfera de la Tierra mediante la producción de oxígeno y dióxido de carbono que consumen (Muller-Feuga *et al*; 2003). Son un grupo amplio de organismos unicelulares o pluricelulares, cuyas células funcionan independientemente, realizando todas las funciones vitales. Presentan o carecen de flagelos, según la especie. La alimentación generalmente es por fotosíntesis. Colonizan una gran variedad de ambientes desde manantiales de agua caliente a los helados casquetes polares, algunas especies muestran una gran resistencia a la sequedad, la alta salinidad, poca luz, etc; en cualquier medio acuático o terrestre, donde exista una fuente de carbono, nutrientes y luz suficiente, junto con el rango apropiado de temperatura (Shelef and Soeder, 1980, Muller-Feuga *et al*; 2003). Proporcionan el material orgánico presente en los ecosistemas acuáticos, el 60% de la fotosíntesis total del planeta y

producen aproximadamente el 50% del oxígeno que respiramos (Barsanti and Gualtieri, 2006). Existen alrededor de 30.000 especies diferentes de microalgas en el mundo (Bold and Wynne, 1985).

El metabolismo microalgal dadas las condiciones de cultivo implica numerosos compuestos bioquímicos de interés en nutrición animal, cosmética, y industria farmacéutica (Otero, 1994, Muller-Feuga *et al.*; 2003). Su plasticidad metabólica permite la adaptación de la especie a una amplia gama de condiciones ambientales. Por ejemplo, cuando no hay disponibilidad de nitrógeno impide a las microalgas la síntesis de proteínas estructurales necesarios para el crecimiento y la división, por lo tanto el metabolismo se orienta hacia la síntesis de carbohidratos que no requieren de nitrógeno (polímeros como el almidón y polisacáridos) y de lípidos importantes, como los carotenoides y ácidos grasos (Suknik and Wahnnon 1991).

La plasticidad metabólica de microalgas ha sido ampliamente estudiada, sobre todo su capacidad para sintetizar ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), benéficos para la alimentación animal. Microalgas también han desarrollado mecanismos anti radicales libres de especies de oxígeno. Al igual que otros microorganismos, que muestran una capacidad de resistir a la competencia y la depredación por la síntesis de sustancias bioactivas (Smith 1994).

Las especies de microalgas seleccionadas para acuicultura son generalmente de vida libre. Todas son pelágicas y en el rango del nanoplancton (2-20µm). Los principales grupos acuáticos en acuicultura; peces, crustáceos y moluscos, demuestran una reducida capacidad para la síntesis de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA, con 20-22 átomos de carbono y más de tres enlaces dobles) por desaturación y elongación de la cadena, síntesis de esteroides baja y pobre capacidad de bioconversión (Thesima and Kanazawa 1974, Trider and Castell 1980; Kanazawa *et al.*; 1985; Enright *et al.*, 1986; Watanabe *et al.*, 1989; Soudant *et al.*, 2000). Los HUFAs y colesterol son por lo tanto sustancias esenciales que deben ser suministradas en la fuente alimenticia. Estas sustancias son abundantes en las microalgas (Lin *et al.*, 1982; Volkman *et al.*, 1989), que poseen 4, 5 y 6 desaturaciones, permitiendo la síntesis de PUFAs esenciales (con más de una doble enlace), así como una gran variedad de fitosteroides, incluyendo el colesterol. Microalgas también puede proporcionar una gran variedad de vitaminas para satisfacer las necesidades de los organismos marinos (Sheguineau *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1999).

Las microalgas constituyen la dieta básica de los bivalvos que no puede ser fácilmente sustituida por dietas artificiales, como sucede parcialmente con peces y crustáceos. La composición de las microalgas está claramente relacionada la fase de crecimiento exponencial o estacionaria así como por las condiciones de cultivo, tales como frecuencia de iluminación (Brown *et al.*, 1993), intensidad de luz (Thomson *et al.*, 1993), la temperatura (Thomson *et al.*, 1992), o medios de cultivo (Wikfors *et al.*, 1996).

Composición Bioquímica Microalgal

Proteínas, carbohidratos y lípidos

Brown *et al.*, (1997) informó de la composición bioquímica de 40 especies de algas cultivadas en condiciones estándar. La proteína fue el componente orgánico más importante (15-52% del peso seco), seguido de los lípidos (5-20%) y carbohidratos (5-12%). El contenido lipídico fue mayor para las diatomeas, siendo el 18% en promedio. La composición bioquímica no siempre se correlaciona directamente con el valor nutricional, debido a la posible deficiencia en algunos nutrientes esenciales. Sin embargo, cuando los nutrientes esenciales se encuentran en proporción adecuada, la composición puede ser importante.

La fase de cosecha y las condiciones de cultivo (nutrientes, temperatura, intensidad de la luz) influyen en la composición bioquímica microalgal. Es generalmente aceptado que, dependiendo de las especies de algas, los lípidos y / o carbohidratos tiendan a acumularse en la fase de senescencia tardía (Wikfors 1986; Whyte 1987, Moal, *et al.*, 1987), independientemente de las condiciones que conducen a esta fase.

Pocos estudios se dedican a la composición de aminoácidos en microalgas. Algunos autores consideran el valor nutricional de las proteínas se debe a su composición de aminoácidos esenciales similar a la de los animales a los que las algas se ofrece como alimento. Aspartato y glutamato son los aminoácidos más concentrados (7,1-12,9%), en tanto que la cisteína, metionina, histidina y triptófano son los menos concentrados (0.4-3.2%), con otros aminoácidos que van desde 3,2 hasta 13,5%.

En términos de composición de carbohidratos, la glucosa aparece como el azúcar predominante en todas las especies. Existen pocas diferencias significativas entre las clases de algas, pero primnesiofitas contener más arabinosa (2-12%) que las otras clases (0-2%). *Phaeodactylum tricornutum* es la única rica en concentración de manosa (46%), tal característica es en relación con el bajo valor nutritivo (Brown *et al.*, 1997), además de demostrar que el ácido araquidónico (ARA) y la composición de azúcar en T-ISO no difirió de la gama de intensidad luminosa probada.

Vitaminas en microalgas

La mayoría de las vitaminas liposolubles se encuentran en las microalgas empleadas en acuicultura (Fábregas and Herrero 1990; Brown *et al.*, 1999). Las vitaminas presentes en las microalgas están presentes en mayor concentración que en los alimentos convencionales, la ingestión de cantidades relativamente pequeñas de microalgas permiten cubrir las necesidades de algunas vitaminas en la alimentación animal, incluida la nutrición humana (Fábregas and Herrero 1990; De Roeck-Holtzhauer *et al.*, 1991) así como niveles recomendados en dietas para peces (Sheguineau *et al.*, 1996). Las mayores diferencias entre las especies son en lo concerniente al retinol y piridoxina que está en relación con la fase de crecimiento.

Con el inicio de la fase estacionaria, riboflavina, tiamina, vitamina E, vitamina C puede aumentar o decrecer dependiendo de la especie (Brown and Miller 1992; Brown and Farmer 1994; Brown *et al.*, 1999); y la vitamina A disminuir (Sheguineau *et al.*, 1993). El contenido de vitaminas principales son similares para todas las especies, mostrando altos niveles de vitamina C, vitamina E, alfa-tocoferol y niacina. En cuanto a su función como nutrientes, algunas vitaminas (por ejemplo, C y E) se ha demostrado poseen función antioxidante. Según lo propuesto por Sargent *et al.*, 1997 los antioxidantes naturales de microalgas pueden reducir al mínimo la peroxidación de los AGPI durante el procedimiento de enriquecimiento.

Esteroles en microalgas

A diferencia de los esteroides humanos, que constan exclusivamente de colesterol, los esteroides de microalgas son muy complejos, así como las especies muestran especificidad. Los esteroides del fitoplancton se encuentran en forma libre en lípidos neutros (Ballantine *et al.*, 1979; Volkman *et al.*, 1981). Los esteroides polares también han sido reportados como una forma glicosilada de los esteroides (Verón *et al.*, 1998). La variación de los niveles de esteroides depende de la fase de crecimiento, nutrientes y condiciones de iluminación de los cultivos (Ballantine *et al.*, 1979; Gordillo *et al.*, 1998). Existen 14 esteroides que han sido fácilmente reconocidos por cromatografía de gases. Las diatomeas son el único grupo microalgal que contiene altos niveles de colesterol que es el esteroide esencial para el crecimiento de moluscos (Trider and Castell 1980), *Chaetoceros* posee hasta un 50%.

Ácidos grasos en microalgas

Los ácidos grasos son moléculas formadas por una larga cadena hidrocarbonada de tipo lineal, y con un número par de átomos de carbono. Tienen en un extremo de la cadena un grupo carboxilo (-COOH). Cada átomo de carbono se une al siguiente y al precedente por medio de un enlace covalente sencillo o doble.

Los ácidos grasos son moléculas anfipáticas, es decir, tienen una región apolar hidrófoba (la cadena hidrocarbonada) que repele el agua y una región polar hidrófila (el extremo carboxílico) que interactúa con el agua. Los ácidos grasos de cadena corta son más solubles que los ácidos grasos de cadena larga porque la región hidrófoba es más corta.

Clasificación de ácidos grasos

Ácidos grasos saturados. Son ácidos grasos sin dobles enlaces entre carbonos; tienden a formar cadenas extendidas y a ser sólidos a temperatura ambiente, excepto los de cadena corta. Poseen una fórmula general de $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$, donde n puede ser cualquier número comprendido entre 4 y 24 átomos de Carbono.

Ácidos grasos insaturados. Son ácidos grasos con dobles enlaces entre carbonos; suelen ser líquidos a temperatura ambiente. Ácidos grasos monoinsaturados. Son ácidos

grasos insaturados con un solo doble enlace. Ácidos grasos poliinsaturados. Son ácidos grasos insaturados con varios dobles enlaces.

Ácidos grasos cis. Son ácidos grasos insaturados en los cuales los dos átomos de hidrógeno del doble enlace están en el mismo lado de la molécula, lo que le confiere un "codo" en el punto donde está el doble enlace; la mayoría de los ácidos grasos naturales poseen configuración cis.

Ácidos grasos trans. Son ácidos grasos insaturados en los cuales los dos átomos de hidrógeno están uno a cada lado del doble enlace, lo que hace que la molécula sea rectilínea.

La composición de ácidos grasos en microalgas generalmente presenta muy consistentes patrones en cada grupo (Napolitano *et al.*, 1990). Estos están distribuidos en tres clases de lípidos: neutros, glucolípidos y fosfolípidos. En los glucolípidos el componente principal está representado por glicéridos como el monogalactosyl y digalactosyl. Los lípidos polares (glicolípidos y fosfolípidos) constituyen las membranas celulares, presentando un alto nivel de insaturación. Los grupos taxonómicos presentan una especificidad en la composición de los ácidos grasos. El contenido de lípidos totales y su distribución varía considerablemente con el estado del cultivo o la cepa utilizada, así como con las condiciones fisicoquímicas del cultivo; por ejemplo cuando decrece el crecimiento y la temperatura, incrementa el contenido de lípidos. La temperatura afecta principalmente a la composición de los galactolípidos, mientras que los nutrientes, principalmente modifican la composición de triglicéridos y fosfolípidos. Disminuyendo la T°C se incrementan los niveles de PUFAs en el plancton marino aunque la respuesta es progresiva y específica según las especies, la luz también ejerce algunos cambios, pero en menor medida.

Compuestos de creciente interés biotecnológico y acuícola son los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y, entre ellos, los ácidos linoleico (18:2 n-6), linolénico (18:3 n-6), araquidónico (20:4 n-6, AA), eicosapentaenoico (20:5 n-3, EPA) y ácido docosahexaenoico (22:6 n-3, DHA). A excepción del linoleico, los otros son raros, siendo las microalgas las productoras primarias de estos compuestos. Algunas de las especies microalgales seleccionadas como potenciales productoras de estos compuestos son *Isochrysis* sp., *Isochrysis galbana* (Otero *et al.*, 1997a, b), *Nannochloropsis* sp. (Servel *et al.*, 1994), *Porphyridium* sp., *Porphyridium cruentum* (Otero *et al.*, 1997b; Fábregas *et al.*, 1998a), *Nannochloropsis oculata* (Okachi *et al.*, 1990; Dunstan *et al.*, 1993; Renaud and Parry, 1994), *Monodus subterraneus*, *Tetraselmis suecica* (Otero and Fábregas, 1997) y *Phaeodactylum tricornutum* (Borowitzka, 1988; Roessler, 1990; Yongmanitchai and Ward, 1991; Bajpai and Bajpai, 1993; Otero *et al.*, 1995; Otero *et al.*, 1997b).

Los PUFAs son considerados esenciales en muchas dietas de organismos marinos por favorecer su crecimiento y rango de supervivencia (Dunstan *et al.*; 1993)

Pigmentos en microalgas

Bajo ciertas condiciones, las microalgas pueden acumular elevadas concentraciones de pigmentos, como ficobiliproteínas: ficocianina, en determinadas cianobacterias y ficoeritrina, extraída de *Porphyridium cruentum* (Fábregas *et al.*, 1998a) para su utilización como colorante natural en alimentación o cosmética y aplicación clínica para inmunoensayos o reactivos biomédicos de diagnóstico. Otro ejemplo es *Dunaliella salina* que acumula β -caroteno, siendo la mejor fuente natural de este pigmento (Borowitzka, 1988). Otros pigmentos son la zeaxantina, astaxantina acumulada por *Haematococcus* (Cordero *et al.*, 1996; Fábregas *et al.*, 2000) y *Chlorella* y luteína, con numerosas aplicaciones industriales, por ejemplo, colorantes alimentarios, precursores vitamínicos, potenciadores del color en salmónidos y yema de huevo.

La microalga más estudiada para la producción de pigmentos ha sido *H. pluvialis* (Boussiba, and Vonshak, 1991; Lee and Ding, 1994) cuya producción de pigmentos puede ser estimulada por la luz y la presencia de acetato en el medio (Cordero *et al* 1996; Fan *et al* 1994) o temperatura (Tjahjono *et al*, 1994) elevada. La carencia de nitrógeno es el principal factor de inducción de los pigmentos (Fábregas *et al*, 1998a). Las microalgas tienen ventajas frente a otros modelos de producción mucho más conocidos como la levadura *Phaffia rhodozyma* ya que la producción de pigmentos en las microalgas alcanza desde el 1% hasta el 5% de su biomasa, mientras que los mutantes de la levadura no superan el 0.4% (Girard *et al*, 1994). Nuestro laboratorio ha encontrado que en peces marinos como el rodaballo y dorada es posible introducir harina microalgal parcialmente purificada en un pequeño porcentaje en el pienso, pudiendo modificar la pigmentación de la piel, es por tanto posible utilizar a las microalgas como transportadoras de pigmentos. La pigmentación puede mejorarse vía cadena trófica en fases tempranas del desarrollo larval y juvenil de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) y fletan (*Hippoglossus*) mediante alimento vivo enriquecido con EPA:ARA en una proporción 4:1 (McEvoy *et al*, 1998, Estévez *et al*, 1999).

Por otra parte la bioencapsulación de rotíferos con microalgas tales como *Isochrysis galbana* Park y *Nannochloropsis* (*Nannochloris*) *oculata* ha demostrado una mejor pigmentación en juveniles de platija (*Pleuronectes platessa*) (Minkoff, 1989). Merchie *et al*, (1996) observaron que existen otro tipo de productos que inciden sobre una mejor pigmentación de juveniles de rodaballo vía alimento vivo., indicando que son eficaces las altas tasas de incorporación de ácido ascórbico sin llegar a la saturación corporal. Estévez and Kanazawa, (1995) demostraron que dietas que tenían una deficiencia de PUFA's (n-3) era posible encontrar una alta incidencia de albinismo o bien problemas en la metamorfosis, observando que los suplementos de alimento vivo bioencapsulado (*Artemia*) con aceites ricos con PUFA's(n-3) y sobredosis de vitamina A influía en la pigmentación y crecimiento.

Devresse *et al*, (1994) demostraron que altos rangos de la proporción DHA-EPA de diferentes enriquecedores comerciales y prototipos de estos (Japón y Bélgica) en alimento vivo (rotíferos y *Artemia*) incrementaron considerablemente la pigmentación de larvas y

juveniles de la platija Japonesa (*Paralichthys olivaceus*) y de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.), además de mejorar considerablemente la sobrevivencia con respecto a enriquecedores ricos en HUFA's (n-3). Al respecto Rainuzzo *et al*, (1994), y Reitan *et al*, (1994) mencionan que la importancia de la pigmentación esta en función de la calidad lipídica y que los ácidos grasos poliinsaturados son el reflejo en la fracción de fosfatidiletanolamina por lo que una disminución de la proporción DHA/EPA se traduce en una mala pigmentación.

Las microalgas como fuente de alimentación y modificación bioquímica de la cadena trófica.

Los intentos pioneros de cultivo de alimento vivo para la acuicultura, trataban de emular las características y condiciones de la cadena trófica oceánica, utilizando las microalgas para alimentar el zooplancton (copépodos, protozoarios, estadios larvales de erizos, moluscos, almejas, daphnia, rotíferos, Artemia), que a su vez es alimentado de estadios larvales tempranos de peces crustáceos y moluscos. El rotífero *Brachionus plicatilis* es el organismo más comúnmente cultivado y estudiado en la actualidad.

Artemia se utiliza como alimento vivo debido a su conveniente almacenamiento y disponibilidad en forma de quiste, su uso hoy en día en la cría de larvas no requiere la producción de microalgas, como nauplios no son realmente grandes, y solo alimentado para enriquecerlo a fin de mejorar su calidad nutricional justo antes de ser utilizado como presa viva.

Las presas vivas son a menudo alimentadas con una única especie de microalgas producida o manipulada bioquímicamente bajo ciertas condiciones de cultivo. Las diferencias son evidentes en el perfil de ácidos grasos, esteroides, vitaminas y minerales así como las proporciones proteína-lípidos-carbohidratos que además dependerá de la especie de microalga empleada. Es así que la composición nutricional de una microalga ofrecida como alimento al zooplancton tiene una influencia en la eficiencia de crecimiento y supervivencia en el siguiente nivel trófico que son los desarrollos larvales tempranos de peces crustáceos y moluscos, dada por la calidad de la presa viva producida (Hagiwara *et al*, 2001, Matsumoto *et al*, 2009).

Nutrición mineral como fuente de modificación bioquímica de la cadena trófica.

El agua de mar es generalmente considerada como una fuente suficiente de minerales para la mayoría de los organismos marinos, pero es un medio intrínsecamente complejo, que contiene más de 50 elementos conocidos, además de un gran número, pero variable de compuestos orgánicos. Por lo general, es necesario enriquecer el agua de mar con nutrientes como el nitrógeno, fósforo y hierro (Barsanti and Gualtieri, 2006). En los sistemas intensivos de producción, los altos niveles de biomasa pueden conducir al agotamiento de los minerales esenciales. Watanabe *et al*, 1983, en un análisis de los

diversos componentes de la alimentación de estadios larvarios, consideró que los minerales no son un factor determinante para el valor de la dieta. Robin 1989 obtuvo un aumento significativo en el crecimiento de turbot, utilizando rotíferos enriquecidos con una premezcla de minerales. Hay poca información en la literatura acerca de los requisitos de minerales y elementos traza y aún menos sobre el efecto del contenido mineral de microalgas en las presas vivas (Lie *et al.*, 1997). El medio mineral utilizado para el cultivo de microalgas debe ser reconsiderado para optimizar el valor nutritivo a través de la cadena alimentaria.

Cada microalga posee necesidades específicas minerales que han de ser cuidadosamente calculadas con respecto a la concentración óptima de nutrientes (Becker and Venkataraman, 1982, Fábregas *et al.*, 1985a, Fábregas and Herrero 1985b, Fábregas *et al.*, 1986a, Fábregas *et al.*, 1986b, Andersen, 2005).

Las recetas de medios de cultivo actualmente disponibles, no siempre son adecuadas para muchas especies, y la elección exacta para una especie en particular depende de ensayo y error. Se debe recordar que en el cultivo en general existen o no métodos equivocados; los medios de cultivo se han desarrollado probando varias adiciones, generalmente basadas en consideraciones teóricas. El perfeccionamiento de la composición de los medios, para el mantenimiento en laboratorio de cultivos microalgales, han sido objeto de investigación por varias décadas, dando lugar a muchas recetas de diferentes medios que se informan en la literatura y que se utilizan en diferentes laboratorios (Harrison *et al.*, 1980; Keller *et al.*, 1987; Fábregas *et al.*, 2000; Berges *et al.*, 2001; Barsanti and Gualtieri, 2006). Las formulaciones de medios de cultivo más empleados hoy en día en acuicultura son: Erdschreiber (Fóyn, 1934), f/2 (Guillard and Ryther, 1962), Walne (1970), algal (Fábregas *et al.*, 1984)

La nutrición y balance mineral es un área poco explotada en acuicultura, recibiendo poca atención en las distintas fases de la nutrición de organismos acuáticos. Algunos metales y metaloides son componentes importantes de enzimas, las cuales catalizan reacciones necesarias en la conversión y transformación de ácidos grasos además de coadyuvar contra daños oxidativos de las membranas celulares; y estar implicados estos microelementos en importantes procesos como la supervivencia, metamorfosis, crecimiento y pigmentación a nivel larval.

Son varios los estudios de la importancia nutricional de minerales en el zooplancton como vía de llegada a estadios larvales tempranos de organismos marinos. Hasta el momento, pocos son los estudios que se han dirigido hacia el enriquecimiento directo de rotíferos con minerales, a excepción de un estudio realizado por Hussain (2002) que examinó el enriquecimiento de rotíferos con calcio como tratamiento de la lordosis. Los minerales son responsables de la formación del esqueleto, el mantenimiento de los sistemas coloidales, la regulación del equilibrio ácido-base, osmorregulación y otros compuestos importantes como las hormonas y enzimas (Watanabe *et al.*, 1997; Barrows and Hardy, 2001; Satoh, 2003), los metales pesados son poderosos prooxidantes en la peroxidación de

los AGPI (Halliwell and Gutteridge, 1993).; sin embargo, sólo pequeñas cantidades de minerales están presentes en el cuerpo.

El zinc se sabe que es un importante elemento traza en nutrición de peces (Watanabe *et al.*,1997; Apines-Amar *et al.*,2004) y un cofactor específico (Muniz-Rossa *et al.*,2002, Manduzio *et al.*,2003, Ahmed *et al.*,2003) para más de 300 enzimas (Vallee and Auld, 1990). Teniendo en cuenta que las deformidades óseas en cultivo de peces disminuyen su valor de mercado, el zinc es un elemento traza necesario para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de huesos sanos (Ma and Yamaguchi, 2001).

El cobre es un metal pesado por naturaleza. Causa peroxidación de lípidos en el alimento y tejido de organismos a través de la formación de radicales libres por reacción redox de sus dos valencias (Cu^+ y Cu^{2+}) o propiedad prooxidante de Cu^+ (Klotz *et al.*,2003). Es un cofactor de sistemas enzimáticos antioxidantes (por ejemplo, la superóxido dismutasa, SOD) y enzimas de la cadena de transporte de electrones (Maage, 1994, Muniz-Rossa *et al.*,2002, Manduzio *et al.*,2003, Ahmed *et al.*,2003).

El selenio es un elemento traza el cual recientemente a recibido considerable atención en nutrición animal ya que actúa como un componente de la enzima glutathione peroxidasa que protege las membranas celulares contra el daño oxidativo (Rotruck *et al.*,1973). En mamíferos, ha demostrado tener un efecto protector contra los niveles tóxicos de metales pesados (Levander, 1986; Rana and Boora, 1992; Rana and Verma, 1997, Reinfelder *et al.*,1998; Cheung and Wang, 2005, Rider *et al.*,2009). Sin embargo, este efecto en peces no ha sido explorado (Yu-Hung and Shi-Yen, 2005, 2007, 2009). La carencia de selenio durante 28 semanas provoca descenso de los niveles de vitamina E en sangre, así como alteración de las células pancreáticas, además de reducir la fragilidad de los eritrocitos en salmón (Bell *et al.*,1987).

La deficiencia en iodo reduce la síntesis de hormonas tiroideas en larvas de halibut, lo que podría estar relacionado con problemas de pigmentación y migración de ojos (Solbakken *et al.*, 2002)

El azufre es un macroelemento esencial para todos los organismos en forma de aminoácidos que contienen azufre; un medio privado de el no puede sostener un crecimiento microalgal.

Cultivos celulares privados de Ca, Fe, Mn, revelan rendimientos significativamente inferiores a los obtenidos con medios donde existen. Calcio importante para el crecimiento máximo de algunas microalgas, aunque su función sigue siendo en gran medida desconocida; Fe es utilizado por las células para oxidación-reducción biológica y producción de clorofila, el manganeso se utiliza para la síntesis de clorofila (Spotte, 1979; Becker 1994; Carvalho, *et al.*,2006).

Hierro; se ha demostrado que el contenido de lípidos polares en algunas microalgas puede incrementarse por varias condiciones de cultivo dentro de las cuales destaca incluir altas concentraciones de hierro, biotecnología de gran aplicación en la obtención de ácidos grasos altamente poliinsaturados (n-3) y lípidos en la producción de biodiesel (Liu *et al.*, 2008, Chih and Wen 2009).

Unos 30 elementos inorgánicos al menos así como muchos compuestos orgánicos pueden ser utilizados por las microalgas para su nutrición (Kaplan *et al.*, 1990; Becker, 1994) distinta de C, N y P; también de importancia son el S, K, Na, Fe, Mg, Ca y oligoelementos tales como B, Cu, Mn, Zn, Mo, Co, V, y Se, como se refleja en la composición elemental de las microalgas (Salisbury and Ross, 1992; Marschner, 1995). Muchos de los oligoelementos son importantes en las reacciones enzimáticas y para la biosíntesis de bastantes compuestos, por ejemplo el Co es esencial para la producción de vitamina B₁₂. El silicio está presente en las paredes celulares de varias divisiones de microalgas, especialmente las diatomeas, la deposición de las estructuras celulares de silicio juegan un papel muy importante en el ciclo biogeoquímico del silicio (Montsant *et al.*, 2005) y es un nutriente esencial para su crecimiento y producción (Healy, 1973). La limitación de silicio produce la acumulación de metabolitos secundarios de alto peso molecular (Arias *et al.*, 2009).

Es en base a lo anteriormente descrito que se plantea importante la manipulación de la nutrición mineral en las microalgas como base de la cadena trófica siendo una herramienta importante que influye en la calidad bioquímica de estas; ahora bien es importante respondernos si la concentración de diferentes macro y microelementos influyen en la productividad y calidad bioquímica de las microalgas, y así mismo observar como responde la acumulación de estos elementos en concentraciones adecuadas en el siguiente nivel trófico (alimento vivo rotíferos y Artemia) desde el punto de vista bioquímico y del ciclo biológico de este nivel trófico.

Dicha evaluación es de relevante importancia ya que el siguiente nivel trófico de la cadena alimentaria marina, lo representan estadios larvales tempranos donde la producción de larvas a escala comercial presenta dificultades tales como altas mortalidades durante la fase larvaria así como mal pigmentación de los simientes, problemas debidos a deficiencias en la calidad alimentaría del alimento vivo que es suministrado en esta etapa crítica.

Respecto a los minerales se han propuesto mecanismos activos y pasivos para la incorporación de oligoelementos por diferentes especies de microalgas. Existen cuatro mecanismos generales de entrada de metales a la célula, los cuales están mediados por moléculas transportadoras:

- ✦ Transportadores que son específicos para un metal dado o que lo transportan de acuerdo a la similitud química de los cationes nutricionalmente esenciales ejemplo: calcio, molibdeno y zinc.
- ✦ Formación de complejos no específicos de formas metálicas con moléculas transportadoras. En este mecanismo y el anterior las reacciones del metal podrían

estar ligadas a la formación de complejos con moléculas transportadoras: las formas metálicas con la energía libre más alta (iones libres) podrían reaccionar más fácilmente con el transportador y ser más disponibles para la incorporación (Sunda y Guillard, 1976).

- ✦ Transporte de metales formando complejos con nutrientes orgánicos esenciales ejm: aminoácidos o proteínas.
- ✦ Transporte de metales, nutricionalmente esenciales, como complejos (Sunda y Guillard, 1976, Anderson and Morel, 1982).

El proceso de transportación no es la única forma de incorporación de oligoelementos. Las formas metálicas solubles en lípidos o de polaridad reducida, podrían atravesar las membranas sin transportador o por transporte pasivo. Su reducida polaridad es la explicación a la alta disponibilidad del metil-mercurio (Phillips and Buhler, 1978).

Gadd and Griffiths, (1978), mencionan que las cantidades de metales que se incorporan a través de mecanismos pasivos y que se ligan a la superficie de las células son muy bajas en relación a las cantidades que se incorporan mediante procesos metabólicos o dependientes de energía (Swartzman 1990). Las paredes de las células algales tienen una gran capacidad para ligar metales. La diatomea *Phaeodactylum* se ha calculado que posee 6.7×10^8 lugares para ligar átomos de plomo por célula (Peterson *et al*; 1975).

Todos los metales pesados son tóxicos para las microalgas a altas concentraciones, aunque el grado de toxicidad difiere en los distintos metales pesados según pertenezcan al grupo de los esenciales (cobre, molibdeno, zinc, etc.) o al de los no esenciales (cadmio, plomo, mercurio etc). En ausencia de metales pesados esenciales, las microalgas disminuyen su eficiencia de crecimiento y se ven afectados uno o más procesos fisiológicos y/o bioquímicos, o es inhibida alguna parte de su ciclo vital o metabólico.

Se ha observado que la pared celular puede adsorber metales de forma pasiva (Ballan-Dufrancais, 1991), la integridad de la membrana plasmática puede ser destruida por un exceso del metal (Tarchevskii *et al*; 1982). Desde el punto de vista estructural, la acción de los metales traza se traduce en la aparición de alteraciones morfológicas (Thomas *et al*; 1980). Este fenómeno ha sido observado en las Chlorophytas (Rosko and Rachlin, 1977), las Chrysophytas (Davies, 1976) y en las Bacillariophytas (Nuzzi, 1972; Berland *et al*; 1977; Morel *et al*; 1978; Stauber and Florence, 1987, 1990).

Así como han sido documentadas ciertas alteraciones a nivel celular por diversos metales, es de hacer hincapié que algunos metales a nivel celular suelen poseer diversas funciones entre las que hay que destacar la de ser precursores de la pigmentación: tal es el caso del Silicio el cual ha sido mencionado por Lebeau y Robert, (2003) como el responsable de poder aumentar la proporción de ácidos grasos poliinsaturados en *Phaeodactylum tricornutum* principalmente el ácido eicosapentanoico (20:5 n-6) (EPA), el cual en proporciones adecuadas con DHA es responsable del nivel de pigmentación muscular en peces.

El selenio es un elemento que dependiendo de su concentración y forma química, puede ser un elemento esencial para la gente, ganado, aves acuáticas, peces y ciertas bacterias. El selenio forma parte de la molécula de varias proteínas, con marcada actividad fisiológica. Así contienen Se, la glutatión peroxidasa (ligada a los mecanismos de producción de radicales libres y a la peroxidación lipídica), la selenio-proteína P y la iodotironina-5-deiodinasa Tipo 1 (ligada a la síntesis de la T3. Su déficit se asocia a un aumento de los radicales libres, a la peroxidación de las LDL, y al mixedema. Su déficit produce despigmentación.

Técnicas de producción microalgal

Las microalgas pueden ser producidas de acuerdo con una gran variedad de métodos, desde los estrechamente-controlados por métodos de laboratorio, a métodos menos predecibles en tanques al aire libre. El cultivo al interior permite controlar la iluminación, temperatura, nivel de nutrientes, contaminación por depredadores, y microalgas competitivas, mientras que en los sistemas de cultivo al aire libre, aunque más baratos, hacen que sea muy difícil el crecimiento de cultivos de microalgales específicos durante períodos prolongados.

Cultivos abiertos, como estanques y tanques al descubierto (interior o exteriores) son más fácilmente contaminados de los recipientes de cultivo cerrados, tales como tubos, frascos, garrafas, bolsas, etc. El cultivo axénico puede también ser elegido, en cultivos de microalgas libres de algunos organismos como las bacterias, pero este cultivo es caro y difícil, porque requiere una esterilización estricta de todos los objetos de vidrio, medios de cultivo, y los recipientes para evitar la contaminación. Estas limitaciones hacen que sea imposible (y muy caras) para operación comercial. Por otra parte, cultivos no axénicos, aunque más baratos y menos laboriosos, son más propensos a accidentes, menos predecibles, y a menudo de calidad desigual. De los diferentes tipos de cultivos de microalgas utilizados en todo el mundo, el más habitual adoptado es el batch, continuo, semicontinuos y fotobiorreactores.

Cultivo discontinuo o "Batch"

Los sistemas de cultivo más comunes son los *cultivos en batch* o *cultivo en discontinuo*, debido a su simplicidad y bajo costo. Este es un sistema cerrado o masivo, de volumen limitado, en el que no hay entrada o salida de ningún tipo de sustrato, es decir, los recursos son finitos. La densidad celular microalgal aumenta constantemente hasta el agotamiento de algún factor limitante, mientras que otros componentes nutritivos disminuyen en el medio de cultivo con el tiempo, o algún tipo de metabolito se acumula hasta alcanzar un nivel toxico. Cuando la tasa de crecimiento disminuye hasta valores próximos a cero, los cultivos están en fase estacionaria. En los *cultivos en batch*, propiedades de las células, como el tamaño, la composición de nutrientes internos, y la función metabólica varían considerablemente.

En estos cultivos la población microalgal va pasando por las distintas fases de crecimiento (adaptación, exponencial y estacionaria), ajustándose por lo general a una función logística (Schanz y Zahler, 1981). A este tipo de cultivo batch (estático o cerrado) en su proceso no se le adiciona ningún tipo de sustrato, ni es retirado algún volumen. Siendo un sistema cerrado puede precisar la incorporación de gases. La población se divide activamente hasta que de acuerdo con Liebing por la ley del mínimo, existirán condiciones en las cuales le es imposible multiplicarse a la población; como es el caso de la disminución de nutrientes, acumulación de metabolitos y materia orgánica hasta alcanzar niveles tóxicos.

Cultivo continuo

En cultivos continuos, los nutrientes son potencialmente infinitos: los cultivos se mantendrán en un punto elegido en la curva de crecimiento mediante la adición regulada de medio de cultivo fresco. En la práctica, un volumen de medio de cultivo fresco se agregará automáticamente a una velocidad proporcional a la tasa de crecimiento de las microalgas, mientras se retira un volumen igual de cultivo. Este método de cultivo microalgal permite el mantenimiento de cultivos muy cerca de la tasa de crecimiento máximo, porque nunca el cultivo permanece sin nutrientes.

Existen dos variantes principales en los sistemas de cultivo continuo: quimiostatos y turbidostatos (Fogg and Thake, 1987). Los quimiostatos se caracterizan por que el medio es introducido en el cultivo a una tasa constante. La concentración en el medio de un nutriente limitante determinará la densidad de celular en cultivo, y el flujo o tasa de dilución determinara la tasa de crecimiento. En los turbidostatos la densidad de la población es controlada por un fotosensor de manera que se mantiene un nivel preestablecido de todos los nutrientes que son añadidos en exceso (Tempest, 1978).

En este tipo de cultivo se puede modificar la composición bioquímica de las microalgas en función de la concentración de nutrientes y de la salinidad (Fábregas *et al*; 1984; 1985a; 1986a; 1986b; 1986d; 1987; 1989b).

Cultivo Semi-continuo

En un sistema semi-continuo una porción del cultivo es retirada (tasa de renovación) y sustituida por medio fresco a intervalos de 24 h tiempo en que nuevamente crece la población antes retirada, repitiendo el procedimiento. La técnica de cultivo semicontinuo prolonga el uso de cultivos en tanques por la recolección periódica parcial.

Con esta técnica es posible mantener elevadas tasas de división celular. Por lo tanto, a pesar de que la producción es continua, la concentración de sustrato y microorganismos no es constante a lo largo del tiempo. El sistema semicontinuo es una alternativa a los sistemas continuos especialmente indicada en el caso de microalgas sometidas a periodos circadianos de luz y oscuridad, ya que la sincronización de la división celular que se produce

en estas condiciones no hace recomendable el cultivo continuo. Si los ciclos de renovación se hacen coincidir con los ciclos circadianos, la biomasa obtenida posee características de homogeneidad y estabilidad que difiere de los cultivos continuos. Propuso se el termino ciclostato para denominar a este tipo de cultivos sometidos a ciclos de luz y oscuridad y diferenciarlos de los quimiostatos estándar (Chisholm *et al.*, 1975 en Ferreira, 2006).

Cultivo Fed-batch

En este tipo de cultivos el sustrato se añade de forma constante, pero no se retira volumen alguno, por lo que el volumen del cultivo se incrementa con el tiempo. Este tipo de cultivos es el que se utiliza industrialmente para la producción de levadura de pan y penicilina.

Los sistemas de producción semicontinua de microalgas con medios de cultivo ricos en nutrientes permiten obtener productividades notablemente más elevadas (Otero, 1994)

Es en base a lo anteriormente referido que el presente estudio, evaluó bioquímicamente la incorporación, primeramente en las microalgas *Isochrysis galbana* var T-iso y *Phaeodactylum tricornutum*; de los elementos Ca, Mg, Se, Si, Fe, Zn, Cu, y S (debido a su importancia biológica en la cadena trófica marina) en diferentes concentraciones y en la reconstitución del medio de cultivo "ALGAL" (Fábregas *et al.*, 1984); así como el posterior desempeño de la manipulación bioquímica de las microalgas, en el siguiente nivel trófico que es el zooplancton; es así que se realizó en el rotífero marino *Brachionus plicatilis* y en *Artemia franciscana*. El empleo de las microalgas *Isochrysis galbana* var T-iso y *Phaeodactylum tricornutum*; fue en base a que la primera especie es altamente apreciada como enriquecedor en la acuicultura industrial de etapas tempranas de desarrollo larval de peces, crustáceos y moluscos, debido a los altos porcentajes de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 que produce como es el caso del ácido docosaenoico (DHA) así como el ácido eicosapentaenoico (EPA) aunque en menor porcentaje (Takeyama, *et al.*, 1996; Øie *et al.*, 1997; Evjemo *et al.*, 2000; Lora-Vilchis *et al.*, 2004; Rico-Villa *et al.*, 2006; Iglesias *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2008; Seixas *et al.*, 2008). En tanto que el empleo de la segunda especie microalgal fue en función de que a pesar de que es una diatomea ampliamente utilizada en estudios ecológicos bioquímicos y fisiológicos (Borowitzka and Volcani, 1978); es una especie que habitualmente no se emplea en los laboratorios de desarrollo larval de organismos acuáticos a pesar de poseer muy importantes porcentajes de ácido eicosapentaenoico (EPA), lo que sin duda haría de esta microalga una especie muy prometedora en maricultura (Zhukova *et al.*, 1998; Spolaore *et al.*, 2006), además de recibir atención debido a su importancia biotecnológica y biomédica en la producción de biomoléculas activas como exopolisacáridos, proteínas solubles y superóxido dismutasa (SOD) (Guzmán-Murillo *et al.*, 2007)

Objetivos

Objetivo general

Evaluación de la mejora en la productividad y en el perfil bioquímico de las microalgas ***Isochrysis galbana* var. T-iso** y ***Phaeodactylum tricornutum***; por la incorporación de los elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en diferentes concentraciones; en la reconstitución parcial y total del medio de cultivo "ALGAL" (Fábregas *et al.*, 1984); así como la estimación *a posteriori* del desempeño de la manipulación bioquímica de las microalgas, en el cultivo e incorporación de minerales del rotífero marino ***Brachionus plicatilis* y *Artemia franciscana***.

Objetivos particulares

Estudio de la incorporación y efecto unitario de los elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en diferentes concentraciones, en el medio de cultivo base sobre la generación de biomasa y composición bioquímica de ***Phaeodactylum tricornutum*(Bohlin)**.

Estudio de la incorporación y efecto unitario de los elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en diferentes concentraciones en el medio de cultivo base sobre la generación de biomasa y composición bioquímica de ***Isochrysis galbana* var. T-iso**.

Evaluación poblacional, modificación bioquímica e incorporación de elementos unitarios por ***Artemia franciscana* y *Brachionus plicatilis***, producida por el enriquecimiento en cultivo con ***Phaeodactylum tricornutum***, cultivada con concentración óptima de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} .

Evaluación poblacional, modificación bioquímica e incorporación de elementos unitarios por ***Artemia franciscana* y *Brachionus plicatilis***, ocasionada por el enriquecimiento en cultivo con ***Isochrysis galbana* var. T-iso**, cultivada con concentración óptima de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} .

Reconstitución del **Medio de Cultivo** en función de los resultados de incorporación en conjunto, de los elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en concentraciones óptimas en dos tipos de medio: **Algal Alto Rendimiento (AARPt, AARTISO)** y **Algal Incremento Concentración EPA y DHA (AEPA y ADHA)** para ***Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. T-iso** respectivamente.

Evaluación del efecto de los medios de cultivo **Algal Alto Rendimiento (AAR)** y **Algal Incremento Concentración DHA (ADHA)** en diferentes concentraciones de nitrógeno, sobre la generación de biomasa, composición bioquímica, e incorporación elemental de ***Isochrysis galbana* var. T-iso**.

Evaluación del efecto de los medios de cultivo **Algal Alto Rendimiento (AAR)** y **Algal Incremento Concentración EPA (AEPA)** en diferentes concentraciones de nitrógeno, sobre la generación de biomasa, composición bioquímica, e incorporación elemental de ***Phaeodactylum tricornutum***.

Estudio poblacional, modificación bioquímica e incorporación de elementos por ***Artemia franciscana* y *Brachionus plicatilis***, ocasionada por el enriquecimiento con ***Phaeodactylum tricornutum*** cultivada con los medios de cultivo **AARPt y AEPA**.

Estudio poblacional, modificación bioquímica e incorporación de elementos por ***Artemia franciscana* y *Brachionus plicatilis***, ocasionada por el enriquecimiento con ***Isochrysis galbana* var. T-iso** cultivada con los medios de cultivo **AARTiso y ADHA**.

Evaluación de la **Capacidad Antioxidante (AA)** y **Contenido Polifenólico Total (CPT)**, en las microalgas ***Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. T-iso**, manipuladas bioquímicamente con los medios de cultivo **Algal Alto Rendimiento (AARPt, AARTISO) y Algal Incremento Concentración EPA y DHA**.

Estudio del **Tamaño Celular (FS)**, **Complejidad Celular o Granularidad (SS)** y **Autofluorescencia (Cla)**, por Citometría de Flujo, en las microalgas ***Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. T-iso**, manipuladas bioquímicamente con los medios de cultivo **Algal Alto Rendimiento (AARPt, AARTISO) y Algal Incremento Concentración EPA y DHA**.

Material y métodos

SISTEMA DE CULTIVO MICROALGAL

El agua de mar empleada para los cultivos se filtró por $0,45\ \mu\text{m}$ (Whatmann GF/C), se ajustó la salinidad a 3,5‰ con un refractómetro Atago S/Mill y se esterilizó a 120°C , 15 Lb presión durante 30 minutos. Una vez estéril y fría, se procedió a su enriquecimiento con nutrientes orgánicos e inorgánicos obteniéndose una concentración final: NaNO_3 , 4 mM; NaH_2PO_4 , 0.22 mM; ZnCl_2 , 1 μM ; MnCl_2 , 1 μM ; Na_2MoO_4 , 1 μM ; CoCl_3 , 0.1 μM ; CuSO_4 , 0.1 μM ; citrato férrico, 20 μM ; tiamina, 35 $\mu\text{g/l}$; B_{12} , 3 $\mu\text{g/l}$; EDTA, 26.4 $\mu\text{g/l}$ (Fábregas *et al.*, 1984). La concentración de nitrógeno es la que determina la concentración final de este medio, siendo de 4 mg átomo N/L. El Tris se eliminó de la formulación inicial para evitar el crecimiento bacteriano (Fábregas *et al.*, 1993).

Incorporación de elementos

Se adicionó al sistema de enriquecimiento por separado Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en las siguientes concentraciones 0, 0,1, 1,0, 10,0 y 100,0 μM (para el caso del Fe^{3+} se incluyó además la concentración 20,0 μM).

Los cultivos a diferentes concentraciones se realizaron por triplicado en minifotobiorreactores tubulares de vidrio, con fondo cóncavo de 30 mm de diámetro con 80 mL de volumen de cultivo, que se dispusieron en una gradilla especial de 60 unidades de cultivo, dispuestas 30 a cada lado, iluminadas centralmente con lámparas fluorescentes OSRAM Daylight L36W/10 (Figura 1a). Se utilizó una intensidad luminosa de $152,3\ \mu\text{mol quanta/m}^2/\text{s}^1$. La intensidad luminosa se midió con un luxímetro Neurtext HD8366. Para la conversión de lux a $\mu\text{mol quanta/m}^2/\text{s}^1$ se utilizó el factor de conversión propuesto por Ginzburg (1987): donde $1\ \mu\text{mol quanta/m}^2/\text{s}^1 = 51,2\ \text{lux}$.

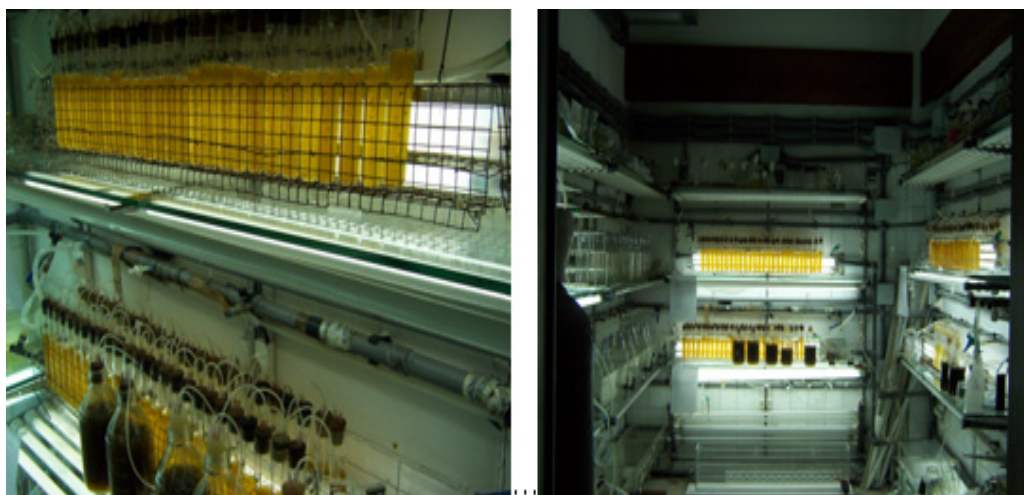


Figura 1 a, b.-Sistema de cultivo microalgal en minifotobiorreactores de 80 mL **(a)**, cámara isotérmica de cultivo **(b)**.

Los cultivos microalgales se sometieron a fotoperiodos circadianos de 12:12 h (luz, oscuridad respectivamente). Cada unidad de cultivo (minifotobiorreactor) se conectó a un sistema de aireación capilar de 1 mm de diámetro desde el fondo del tubo (Figura 2) que proporcione un flujo de aireación continua de 250 mL/min^1 , suplementado con inyecciones de CO_2 de 10 segundos cada 10 minutos durante el período de luz, con el objeto de mantener el pH de los cultivos entre 7,5 y 8, además de proveer una fuente de carbono inorgánico. El sistema de cultivo se situó en una cámara isotérmica con una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (Figura 1b).

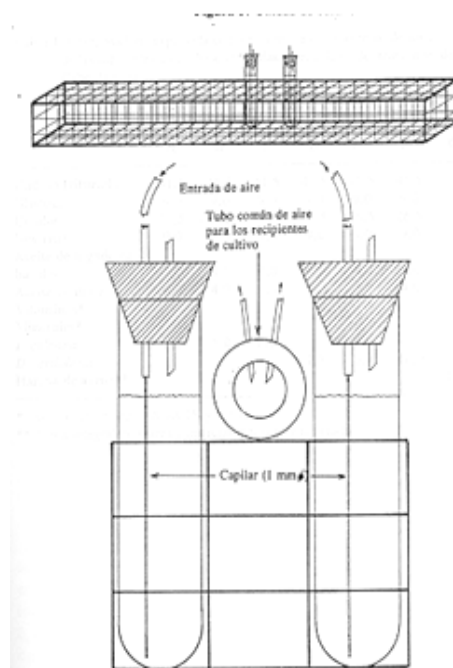


Figura 2.- Operación de Minifotobiorreactores de 80 mL, para el cultivo microalgal (tomado de Cabezas Del Toro, 1991)

A cada minifotobiorreactor se le inóculo en fase estacionaria una densidad inicial de microalgas a razón de $1,0\text{-}1,5 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$. Inóculo previamente cultivado en matraces de 1 L con una concentración 4 mg átomo N/L.

Tal densidad celular se seleccionó de acuerdo a lo recomendado por Gamallo, (1992), y Otero, (1994) y así evitar una fotoinhibición celular en el cultivo discontinuo. Los cultivos se dejaron llegar hasta el final de la fase logarítmica. Se considero que alcanzó la fase estacionaria cuando la densidad celular en cultivo se mantenía constante durante tres días consecutivos como mínimo. Es en ese momento que se inicio el régimen semicontinuo de cultivo. Básicamente, el sistema de cultivo semicontinuo consiste en retirar diariamente a primera hora del ciclo de luz una parte del cultivo (Fábregas *et al*; 1994, Fábregas *et al*, 1995), substituyéndose por medio fresco. El porcentaje de volumen de cultivo que se retiró se denomina tasa de renovación. En los experimentos realizados la tasa de renovación empleada fue del 30% que en estudios realizados por (Otero 1994; Fábregas *et al*; 1995; 1998, Ferreira 2006) resulta ser la mejor tasa productiva y bioquímicamente hablando.

SISTEMA DE CULTIVO *Brachionus plicatilis*.

Se cultivo masivamente a el rotífero marino *Brachionus plicatilis* en Carboy's de 6 L con agua de mar autoclavada durante 20 min. a 120°C y 15 lb. de presión, con aireación a razón de 6 a 8 burbujas por minutos y fotoperíodo circadiano 12:12 (luz-oscuridad respectivamente) en una cámara isotérmica cultivo con 22±2°C (figura 3a). Diariamente los rotíferos fueron alimentados con dietas mixtas de microalgas frescas de varias especies: *Tetraselmis suecica*, *Nannochloropsis gaditana*, *Isochrysis galbana*, *Isochrysis galbana* var T-iso, *Rhodomonas lens* y *Phaeodactylum tricornutum*. Aproximadamente cada semana los rotíferos filtraban y lavaban en periodos cortos con agua destilada para eliminar microbiota y posteriormente pasarlos a un nuevo carboy con agua de mar estéril. Tal proceso preventivo se realizó un día antes de iniciar los experimentos con la finalidad de estabulación alimentaria y sanidad de los rotíferos. Para realizar las experiencias de crecimiento poblacional, modificación bioquímica e incorporación de elementos, los rotíferos a razón de 50 rotíferos.mL⁻¹ se transfirieron a botellas de 1 L, sometidos a un flujo de aire de 20 burbujas.minuto⁻¹ aproximadamente, ciclos de luz:oscuridad 12 h:12 h, se utilizo una intensidad luminosa de 52,3 $\mu\text{mol quanta/m}^2/\text{s}^1$ (figura 3b) y mantenidos los cultivos en una cámara isotérmica con 22±2°C.



Figura 3 a, b.-Sistema de cultivo masivo Carboy's 6 L (a) y cultivo/enriquecimiento 1 L (b), del rotífero marino *Brachionus plicatilis*.

SISTEMA DE CULTIVO *Artemia franciscana*.

Se incubaron y eclosionaron en agua salobre a 2,5%, filtrada (1 μm), quistes de *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) del Gran Lago Salado Utha (INVE, Aquaculture, Inc.), en un baño termostático a 28±1°C, una intensidad luminosa de 152,3 $\mu\text{mol quanta/m}^2/\text{s}^1$; por 24 h y un flujo de aireación continua de 250 mL/min¹ (figura 4a). Una vez eclosionados los nauplios se lavaron con agua destilada y formalina al 4% por 10 segundos, como

tratamiento bacteriano preventivo; posteriormente se mantuvieron en agua marina estéril al 3,5%. Se espera a que los metanauplios cumplieran 48 h después de la eclosión (DDE), tiempo en el cual han desarrollado un sistema digestivo eficaz-completo y pueden empezar a filtrar no selectivamente alimento (Sorgeloos *et al.*, 2001). Para realizar las experiencias de crecimiento, supervivencia, modificación bioquímica e incorporación de elementos, los metanauplios_{48h} se transfirieron a razón de 2 metanauplios.mL⁻¹ en un volumen de 500mL en botellas de 1 L, sometidos a un flujo de aire de 20 burbujas.minuto⁻¹ aproximadamente, ciclos de luz:oscuridad 12 h:12 h, se utilizó una intensidad luminosa de 52,3 $\mu\text{mol quanta/m}^2/\text{s}^1$ (figura 4b), las botellas de cultivo se mantuvieron en un baño termostático a $28\pm 1^\circ\text{C}$ dentro de una cámara isotérmica a $22\pm 2^\circ\text{C}$.

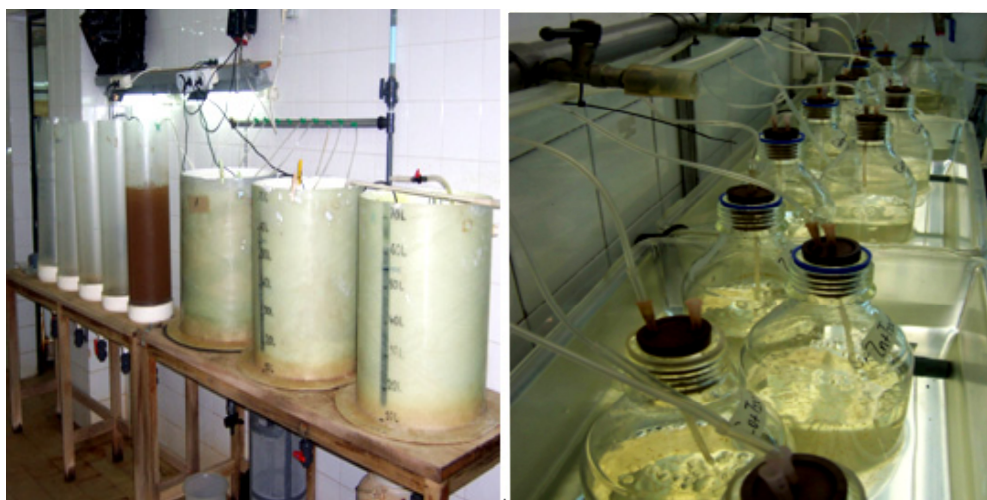


Figura 4 a, b.- Sistema de incubación y eclosión **(a)** y cultivo/enriquecimiento 1 L **(b)**, de *Artemia franciscana*.

Métodos de evaluación de la Biomasa Microalgal y obtención de Biomasa Zooplanctónica (Rotíferos y Artemia)

RECUESTO CELULAR

El recuento celular de los sistemas de cultivo discontinuo y semicontinuo se realizó durante la primera hora del ciclo de luz. En el caso del cultivo semicontinuo el conteo se realizó en el volumen de renovación. La densidad celular se obtuvo mediante el conteo de muestras diluidas con agua de mar filtrada y autoclavada, al microscopio de contraste de fase (Nikon Labophot) en cámara Improved Neubauer (Brand) y fijada la muestra microalgal con lugol antes de la dilución. El número de células se obtuvo por campo de recuento de 1 mm² en donde debiesen encontrarse, con base en la dilución una media entre 30 y 300 células (ICSH, 1988).

Una vez constatado por triplicado el establecimiento de la fase estacionaria (por tres días consecutivos con un error inferior al 10%) para todas las condiciones experimentales, se comenzó con el cultivo semicontinuo con una tasa de renovación del 30%. Una vez obtenida la estabilización del cultivo en semicontinuo por triplicado se recogió biomasa.

La biomasa microalgal para efectuar la analítica de proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, oligoelementos, capacidad antioxidante, contenido total de polifenoles, citometría de flujo y análisis elemental; se recogió por centrifugación de 5 o 10 mL en una centrífuga de rotor basculante Kubota KS8000 a 3000 rpm por 10 min. en tubos de vidrio de alta resistencia pyrex. Se retiró el sobrenadante y el pellet se almacenó en ultracongelación a -30°C. La recogida de la biomasa se realizó por quintuplicado para cada condición.

Los rotíferos al día 8 de cultivo se cosecharon, contabilizaron y limpiaron de materia orgánica filtrándose a través de un filtro de malla nitex de 300 y 60 µm de luz de malla; en esta última es que se cosecharon (por volumen) y lavaron con agua destilada y se ultracongelaron a -50°C, para los análisis de proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos y oligoelementos (n=5).

Los adultos de *Artemia* entre el día 7-9 de cultivo se cosecharon, contabilizaron y limpiaron de materia orgánica, filtrándose a través de una malla nitex de 500 µm de luz de malla; se lavaron con agua destilada, se contabilizaron 40 organismos por análisis de proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos y oligoelementos por quintuplicado en tubos de ensayo y se ultracongelaron a -50°C.

Cálculo de la tasa o índice de crecimiento

La tasa de crecimiento de los cultivos de rotíferos se calculó con la siguiente fórmula (Scott and Baynes, 1978; Krebs, 1985; Wood *et al.*, 2005):

$$r = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t - t_0}$$

Donde N_0 =densidad inicial de rotíferos, N_t =densidad final de rotíferos y $t-t_0$ =duración del cultivo en días.

El cálculo de la velocidad de crecimiento en *Artemia* se realizó dividiendo la longitud total entre el número de días de cultivo del organismo.

Determinación de TCA y eficiencia de crecimiento

La tasa de conversión alimenticia *Artemia* y rotífero (TCA) se calculó dividiendo el peso seco de la microalga adicionada entre el peso seco producido de los organismos (Steffens, 1987).

El porcentaje de eficiencia de crecimiento se determinó con la siguiente fórmula:

$$\%EC = (\text{Peso seco final}_{\text{organismo}} / \text{Peso seco}_{\text{microalga}}) * 100 \text{ (Reeve, 1963)}$$

DETERMINACIÓN DE NITRATO EN EL MEDIO DE CULTIVO

Se centrifugaron 5 mL de cultivo durante 15 minutos a 3100 rpm. El sobrenadante se filtro a través de un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/C de 0.45 μm de tamaño de poro a otro tubo. Para determinar la cantidad de NO_3^- se leyó a 220 nm en un espectrofotómetro utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm^3 (Collos *et al.*, 1999). Como patrón se utilizó una serie de diluciones por triplicado de NaNO_3 100 mM en agua de mar filtrada a fin de obtener concentraciones: 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0325, 0.015625, y 0.0078125 mM, las lecturas se ajustaron a una recta por mínimos cuadrados ($R^2=0.99$) de donde, por interpolación, se dedujo la concentración de nitrato en el medio de cultivo.

DETERMINACIÓN PESO SECO Y CENIZAS DE LAS CELULAS, ROTIFEROS Y ARTEMIA.

La cosecha de microalgas para determinación del peso seco celular se efectuó en filtros Whatman GF/C previamente lavados con agua des-ionizada. Los filtros una vez lavados se secaron y carbonizaron en una mufla a 500°C durante 24 h para eliminar residuos de fabricación de los filtros y trazas de materia orgánica que pudieran contener; posteriormente se pesaron en una balanza analítica Sartorius modelo 2405 ($d=\pm 0.001$ mg).

A través de ellos se filtró entre 5 y 10 mL de cultivo, según la densidad celular (cuanto menor fue la densidad celular más volumen de cultivo se filtro y así minimizar posibles errores debidos a la técnica). Con el fin de eliminar sales procedentes del agua de mar los filtros con biomasa microalgal se lavaron tres veces con una disolución isotónica (0,5 M) de formiato amónico. Los filtros sécaronse durante 24 h en un horno convectivo a 60°C. Posteriormente tales filtros pesaronse en la balanza analítica. El peso seco se obtuvo por la diferencia entre el peso del filtro carbonizado y el peso seco del filtro una vez filtrada la muestra (Utting, 1985).

La determinación del peso seco de los rotíferos y artemias se realizó de manera similar, solo que los filtros únicamente se lavaron con agua des-ionizada.

ANÁLISIS ELEMENTAL (C-H-N)

Para la determinación del peso seco liofilizado, las muestras contenidas en los tubos previamente pesados y ultracongelados a -30°C fueron inmediatamente transferidas a un liofilizador Labconco Lyphe-Lock 6. Una vez liofilizada la biomasa microalgal, los tubos fueron pesados de nuevo para determinar el peso seco de las muestras empleadas para el análisis elemental.

El análisis de composición elemental (carbono, hidrógeno y nitrógeno, C-H-N) se efectuó sobre alícuotas de biomasa liofilizada homogenizada. Pesaronse entre 1 y 2 mg de muestra en una balanza analógica Sartorius ($d=\pm 0.001$ mg) en una cápsula especial de estaño. Para la realización de los análisis se utilizó un autoanalizador Carlo Erba 1108, equipado con un autosampler AS200.

El método analítico se basó en una oxidación instantánea y completa de la muestra, que convierte todas las sustancias orgánicas e inorgánicas en productos de combustión. Los gases resultantes de la combustión pasan a través de un horno de reducción y son arrastrados al interior de una columna cromatográfica (Porapak PQS) por el gas transportador, en este caso helio, donde son separados para su detección, por un detector de conductividad térmica, que emite un señal proporcional a la concentración de los componentes individuales de la muestra.

El instrumento se calibra con acetanilida, estándar aconsejado para muestras con alto contenido orgánico, siendo la concentración de las muestras calculada mediante un algoritmo de regresión lineal en base al área debajo de los picos generados por el detector. Para la realización de estos cálculos el autoanalizador está equipado con un ordenador (EAGER 200 Workstation).

TÉCNICAS ANALÍTICAS

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN BIOMASA CELULAR Y ORGANISMOS (ROTIFEROS Y ARTEMIA)

Análisis del contenido de proteínas por el método Lowry.

El método utilizado consiste en una modificación del método de Lowry *et al.*, (1951) propuesta por Herbert *et al.*, 1971. El reactivo de fenol de Folin & Ciocalteu, que es esencialmente una solución de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, es reducido por los fenoles (y por otras muchas sustancias) a azul de molibdeno que puede ser determinado colorimétricamente. Las proteínas reducen el reactivo de fenol, que puede ser por lo tanto utilizado para su determinación. Sin embargo, la cantidad de color producida varía en gran manera para distintas proteínas, ya que esta reacción es debida casi enteramente a su contenido en tirosina y triptófano, siendo el resto de los aminoácidos poco influyentes. Como resultado, la reactividad de este ensayo frente a una proteína determinada dependerá de la composición de dicha proteína y de la presencia de otra sustancia que pueda oxidar el reactivo de fenol de Folin (Herbert *et al.*, 1971).

El pre-tratamiento de las proteínas con álcali y la presencia de trazas de sales de cobre en el medio incrementan el color desarrollado con el reactivo de Folin & Ciocalteu. Las sales de cobre no incrementan la cromogenicidad de los aminoácidos libres tirosina y triptófano y el efecto es presumiblemente debido a complejos del cobre con otros aminoácidos. Esta modificación del método original de Folin & Ciocalteu no sólo incrementa la sensibilidad sino que también reduce las diferencias en cromogenicidad de distintas proteínas. Un estudio complejo de esta técnica fue realizado por Lowry *et al.*, 1951, y una adaptación de éste para el análisis de microorganismos fue propuesta más tarde por Herbert *et al.*, 1971.

Para la realización del análisis se cosecharon 5 o 10 mL de cultivo fresco centrifugado (3100 rpm, 15 min.) (posteriormente ultracongelados a -30°C), en el caso de biomasa

microalgal, para rotíferos entre 50 y 70 mL de cultivo concentrado filtrado y 40 organismos adultos de artemia. Se sometieron a hidrólisis añadiendo 2 mL de NaOH 1N, a una temperatura de 95-100°C durante 60 min. en baño maría. Las muestras se enfriaron y clarificaron por centrifugación (3000 rpm 10 min.). Se transfirieron por triplicado 0,1 mL de esta solución a un nuevo tubo de ensaye y se les añadieron 0,3 mL de H₂O destilada. A esta mezcla, al igual que a la curva patrón y a un blanco con 0,4 mL de agua destilada, se le añadieron 0,4 mL de NaOH y 2 mL de Na₂CO₃ 5% (W:V) al que se añade previamente una solución de CuSO₄·5H₂O al 0.5% (W:V) en tartrato de sodio-potasio al 1% (W:V), en una relación 50:2 (W:V). Las muestras se dejan reaccionar durante 10 min. a temperatura ambiente antes de añadirles 0,4 mL del reactivo comercial de fenol Folin & Ciocalteau (Merck) diluido a la mitad con agua destilada.

Las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 min. antes de leer la absorbencia a 750 nm en un espectrofotómetro HP8453E-DA utilizando una cubeta de vidrio de 1 cm³ contra el blanco de reactivos tratado con los mismos reactivos.

Como patrón se utilizó una dilución de 1 mg/mL de sero-albúmina bovina (BSA). La curva patrón se construyó con 25, 50, 75, 100, 200 y 400 µL de esta disolución. Los resultados de esta absorbencia de la curva patrón se ajustaron por mínimos cuadrados a una ecuación de segundo grado ($R^2=0.99$) a partir de la cual se calcularon por interpolación los valores de la proteína de las muestras problema.

No se aceptaron resultados que presentasen un coeficiente de variación entre las réplicas mayores del 10%, repitiéndose el análisis.

ANÁLISIS DEL CONTENIDO LIPÍDICO (Marsh and Weinstein, 1966), EN BIOMASA CELULAR Y ORGANISMOS (ROTÍFEROS Y ARTEMIA)

Para la determinación del contenido lipídico de la biomasa se utilizó un ensayo cuantitativo basado en la carbonización (Marsh and Weinstein, 1966), que es un método rápido y con una sensibilidad mayor que otros métodos colorimétricos (Amenta, 1964; Dittmer and Wells, 1969). Este método general e inespecífico permite una rápida estimación de los lípidos totales de una muestra biológica. Las principales ventajas de este procedimiento son su rapidez, sensibilidad, reproducibilidad y el empleo de un reactivo simple y estable como es el ácido sulfúrico concentrado.

Se carbonizaron con ácido sulfúrico concentrado cantidades entre 5 y 300 µg, estimándose la concentración lipídica con una reproducibilidad de ±1%, ya que existe una relación entre la densidad óptica de los lípidos carbonizados y la concentración inicial de lípidos.

La longitud de onda a la cual el ensayo presenta una mayor sensibilidad es 375 nm. A esta longitud de onda la relación entre la absorbencia y las concentraciones de lípidos es lineal para todas las clases de lípidos ensayados (Marsh y Weinstein, 1966).

Para su posterior determinación, los lípidos se extrajeron por el procedimiento de Bligh and Dyer 1959 tal y como describen Holland and Gabbott 1971. Se emplearon 10 mL de cultivo fresco centrifugado (3100 rpm, 15 min.) (posteriormente ultracongelados -30°C), en el caso de biomasa microalgal, para rotíferos entre 50 y 70 mL de cultivo concentrado filtrado y 40 organismos adultos de artemia. Se añadieron a la muestra 4,5 mL de $\text{CHCl}_3\text{:CH}_3\text{OH}$ (1:2 V:V). Para facilitar la extracción, las muestras se trataron con un disruptor celular durante 5 minutos y con un sonicador por 2 min. para facilitar la extracción en frío a 4°C. Se centrifugaron (3100 rpm 10 min) y se recolectó el sobrenadante. Posteriormente se añadieron 1,5 mL de CHCl_3 y 1,5 mL de agua destilada para la separación de la fase polar y apolar. Los tubos de ensaye se agitaron y centrifugaron durante 5 min a 3100 rpm para facilitar la separación de las dos fases. La fase apolar (inferior) se extrajo con una pipeta Pasteur a un nuevo tubo de ensaye. El extracto lipídico así obtenido se llevó a sequedad mediante la evaporación de CHCl_3 en un horno a 37°C. Este extracto lipídico total se resuspendió en 1 mL de CHCl_3 , repartiéndose por triplicado alícuotas de 200 μL de cada uno de estos extractos que vuelven a llevarse a sequedad en un horno a 37°C.

Paralelamente se preparó una disolución de tripalmitina (Sigma, T-58888) de 0,3 mg/mL en CHCl_3 para su utilización como patrón, utilizándose para la construcción de la recta patrón tubos de ensaye con 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 y 0,9 mL de esta disolución que son evaporados al igual que las muestras.

Una vez evaporado el solvente de muestras, patrón y blanco, se retiraron los tubos del horno y se dejaron enfriar, añadiendo a continuación 2 mL de ácido sulfúrico concentrado en cada tubo de ensaye. Se colocó un blanco con 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se colocaron los tubos de ensaye en un horno convectivo a 200°C durante 15 min para la carbonización del extracto lipídico. A continuación los tubos se colocaron a temperatura ambiente durante 15 seg. y a 4°C durante 5 min. Se añadieron 3 mL de agua destilada en cada tubo, mezclándose bien. Los tubos se colocan de nuevo a 4°C. Una vez fríos se retiraron y colocaron a temperatura ambiente aproximadamente 10 min., hasta que desaparecieron todas las burbujas.

La absorbencia de las muestras se midió a 375 nm en un espectrofotómetro HP8453E-DA en cubetas de vidrio de 1 cm^3 contra el blanco de referencia.

Los valores de lectura de los tubos de tripalmitina se utilizaron para el cálculo de la recta patrón mediante un ajuste lineal por mínimos cuadrados ($R^2=0.99$). Los valores de lípidos en las muestras problema se calcularon por interpolación utilizando esta recta. No se aceptaron resultados que presentasen un coeficiente de variación entre las réplicas mayores del 10%, repitiéndose el análisis.

ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS, EN BIOMASA CELULAR Y ORGANISMOS (ROTIFEROS Y ARTEMIA)

Todos los métodos propuestos para la determinación de hidratos de carbono totales son colorimétricos, y derivan del Test de Molish para carbohidratos; implicando el calentamiento del material con ácido sulfúrico concentrado y un desarrollante de color que es usualmente una amina aromática o un fenol (Herbert *et al.*, 1971).

El método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) continúa siendo el más utilizado y poco ha sido modificado. Es muy insensible a la interferencia con proteínas y el color producido es muy estable. Su única interferencia posible viene dada por las pentosas componentes de los ácidos nucleicos, pero su simplicidad lo convierte en el método más extendido en las investigaciones de este tipo (Kochert, 1978).

Se emplearon muestras de 5 o 10 mL de cultivo fresco centrifugado (3100 rpm, 15 min) (posteriormente ultracongelados a -30°C), en el caso de biomasa microalgal, para rotíferos entre 50 y 70 mL de cultivo concentrado filtrado y 40 organismos adultos de artemia. Se resuspendieron en 4 mL de NaOH 1N. Las muestras se sonicaron para facilitar su disolución. Se repartió por triplicado 1 mL de esta disolución. Paralelamente se preparó un blanco con 1 mL de NaOH 1N y se distribuyeron en tubos 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1 mL de una disolución de glucosa anhidra de 1 mg/mL en NaOH 1N, enrasándose los tubos hasta un volumen de 1 mL con NaOH 1N.

A los tubos de ensaye se les añadieron 25 µL de fenol al 80% en agua destilada y se mezclaron bien. Inmediatamente se adicionaron 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, dirigiendo la caída del ácido hacia la superficie del líquido y agitando el tubo. Tras reposar 30 min. a temperatura ambiente, se leyó la absorbencia de las muestras a 485 nm en un espectrofotómetro HP8453E-DA en cubetas de vidrio de 1 cm³ contra el blanco. Los valores de la muestra de glucosa se ajustaron a una recta por mínimos cuadrados ($R^2=0.99$) de donde, por extrapolación, se dedujo el contenido de carbohidratos de las muestras problema. No se aceptaron resultados que presentasen un coeficiente de variación entre las réplicas mayores del 10%, repitiéndose el análisis.

CÁLCULO DEL VALOR CALÓRICO DE LA BIOMASA CELULAR Y ORGANISMOS (ROTIFEROS Y ARTEMIA)

Los valores calóricos se calcularon a partir del contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos obtenidos mediante las técnicas analíticas anteriormente descritas, utilizando las fórmulas de conversión propuestas por el National Research Council 1977:

Valor calórico (kcal/g) = 5,72 (Peso proteína) + 9,50 (Peso lípidos) + 4,03 (Peso carbohidratos)

La conversión de calorías a julios se realizó teniendo en cuenta la relación:

$$1 \text{ caloria} = 4,185 \text{ Julios}$$

ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS DE LA BIOMASA CELULAR Y ORGANISMOS (ROTIFEROS Y ARTEMIA).

La obtención de ácidos grasos consta de dos fases: primeramente se realiza una extracción lipídica de la muestra y a continuación el extracto lipídico y esterificado para obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos que serán analizados en el cromatógrafo de gases.

La extracción de los lípidos se efectúa según el método de Bligh and Dyer 1959 a partir de las muestras congeladas de cultivo de microalgas frescas y centrifugadas (3.100 rpm, 15 min.), en el caso de rotíferos entre 50 y 70 mL de cultivo concentrado filtrado y para *Artemia* 40 organismos adultos también congelados. Los lípidos se extrajeron con 3 mL de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2 v:v). Para facilitar la extracción en las muestras de rotífero y *Artemia*, se dejaron reposar a 4 °C durante 30 minutos, posteriormente se sonicaron por 2 min. y además 5min en el disruptor celular a 4°C. Los tubos de ensaye conteniendo las muestras se mantuvieron en oscuridad para evitar la degradación de los ácidos grasos. Los extractos lipídicos se centrifugaron por 10 min., para posteriormente obtener el sobrenadante con una pipeta Pasteur, a continuación se le agrego 1,8 mL de agua destilada y 1,8 de CHCl_3 ., se homogenizo y se centrifugo para separar y eliminar la a fase acuosa. A la fase apolar se le agregaron 50 µL de una disolución 1 mg/mL de triheptadecanoína (17:0 Sigma) como estándar interno. A continuación se evaporo el cloroformo mediante un flujo de N_2 . Los extractos lipídicos fueron sometidos a metanólisis mediante la adición de 2 mL de $\text{HCl}:\text{CH}_3\text{OH}$ al 5% y baño maría a 85°C durante 2,5 horas (Sato and Murata, 1988). Los metilésteres de los ácidos grasos obtenidos, se separaron de la fase polar mediante una doble extracción con hexano grado HPLC y fueron concentrados por evaporación con N_2 y resuspendidos en hexano 99,9% en un volumen de 100 o 200 µL, dependiendo de la concentración de los ácidos grasos.

La separación e identificación de los ácidos grasos se realizo en un cromatógrafo de gases GC8000 Series acoplado a un espectrómetro de masas MD800 Perkin-Elmer, empleando una columna Omegawax™ 250 fused silica (Supelco) de 30 m de longitud y 0,25 mm de diámetro. Las condiciones de análisis fueron las siguientes: volumen inyectado, 1 µL; gas portador, He; flujo de gas en la columna, 0,8 mL/min.; relación splits, 1,99; temperatura inyector, 230°C. Método del cromatógrafo: tiempo de splitless, 1 min.; rango de temperaturas, 1 min a 35°C, rampa de 35°C/min. hasta 200°C en 45 min. a 200°C. Método de adquisición de espectros de masas: retardo del solvente, 4,5 min.; rango de masas, 10-400; tiempo interscan, 30 s.

Los ácidos grasos fueron identificados mediante la comparación de los espectros de masas con los espectros contenidos en la base de datos de espectros de masas NIST and WILEY. Esta identificación fue confirmada mediante la comparación con un patrón comercial de metilésteres de ácidos grasos PUFA-3 (Metreya Inc., Pleasant Gap, PA, USA). El cálculo de la concentración se realizo mediante la integración del área de los picos, que en el sistema GC-MS es directamente proporcional a la masa.

ANÁLISIS DE LA ABSORCIÓN DE METALES EN LA BIOMASA CELULAR Y ORGANISMOS (ROTIFEROS Y ARTEMIA).

La determinación del contenido de metales y metaloides se realizó mediante espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). En esta técnica, la muestra es normalmente transportada al interior del equipo como una corriente líquida que se convierte en un aerosol mediante el proceso conocido como nebulización. La muestra en forma de aerosol se transporta al plasma, donde es desolvatada, vaporizada, atomizada y excitada y/o ionizada por el plasma. El plasma es formado con un flujo de gas argón que pasa a través de un campo de radiofrecuencia donde es mantenido en un estado de ionización parcial. Esto permite alcanzar temperaturas muy altas, de aproximadamente unos 10.000°C. A altas temperaturas, la mayor parte de los elementos emiten luz en una longitud de onda característica. Esta radiación es detectada y puede convertirse en información sobre concentración. La emisión de luz de los diferentes elementos que componen la muestra es separada en diferentes longitudes de onda por medio de una señal que es capturada por detectores sensibles a la luz, una por cada elemento a analizar. Esto permite el análisis y detección de más de 70 elementos químicos en una muestra. En términos de sensibilidad, puede compararse con absorción atómica de llama, así que los límites de detección están normalmente en soluciones acuosas a niveles de µg/L (Boss and Fredeen, 1997). El equipo utilizado fue un ICP-OES da marca PerkinElmer, modelo Optima 4300 DV. Para la introducción de la muestra se ha utilizado una cámara de spray tipo ciclónico y un nebulizador Low Flow. Las condiciones de trabajo han sido las siguientes: potencia del generador de RF: 1450 watios, flujo del Nebulizador: 0,6 L/min., flujo del plasma: 15 L/min.

Se emplearon 10 mL de cultivo fresco centrifugado (3100 rpm, 15 min.) (posteriormente ultracongelados a -30°C) para el caso de la biomasa microalgal, en el caso de rotíferos entre 50 y 70 mL de cultivo concentrado filtrado y para Artemia 40 organismos adultos también congelados.. A las muestras en tubos de ensaye pyrex con tapones de rosca se les adicionó 3 mL de HNO₃ al 65 %. Posteriormente se digirieron en baño maría a 90°C durante 2 h. Se enfriaron a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 3100 rpm, 15 min. Se extrajo el sobrenadante y se colocó en otro tubo de ensaye. Cuando las muestras no sedimentaron las impurezas por centrifugación, se filtraron por filtros de fibra de vidrio Whatman (GF/C). Finalmente se diluyeron por triplicado las muestras 1:10 con agua MilliQ a fin de obtenerlas al 6,5% de ácido nítrico, se preparó de igual manera un blanco de reactivos digerido y una matriz a la misma concentración. No se aceptaron resultados que presentasen un coeficiente de variación entre las réplicas mayores del 10%, repitiéndose el análisis.

ANALISIS DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES

Se empleó DPPH (2,2-difenil-1-picridazilo) en disolución con metanol (MeOH) 6×10^{-5} M (4°C), reactivo Folin & Ciocalteu, ácido gálico, carbonato sódico (7,5%). Todos los reactivos utilizados en la experimentación fueron grado analítico, obtenidos en la casa comercial Sigma-Aldrich (Alemania).

Las muestras liofilizadas se trituraron en un mortero. Se pesaron 30 mg los cuales se disolvieron en 1 mL de MeOH. A continuación se sometieron las muestras a un baño ultrasónico (4°C) durante 45 min. Se centrifugaron a 4500g por 10 min., repitiéndose el procedimiento anterior una vez más. Los extractos se almacenaron a -80°C.

La Capacidad Antioxidante de los extractos fue evaluada empleando un espectrofotómetro Jasco V-530 (Jasco Corporation Tokio Japón) por medio del método de DPPH (2,2-difenil-1-picridazilo) en disolución con MeOH 6×10^{-5} M con algunas modificaciones. En una cubeta de cuarzo se colocaron 980 μ L de disolución de DHHP en fresco más 20 μ L del extracto microalgal se mezcló y se midió la absorbancia a 515 nm hasta estabilización de la reacción a temperatura ambiente, utilizándose como blanco de reactivos metanol. Asimismo, una alícuota de DPPH se empleo como control. Los resultados son expresados como % de Inhibición del radical DPPH/mg de peso seco liofilizado de microalga y calculado como la media \pm desviación estándar (SD) ($n = 3$). El % de Inhibición por el radical DPPH fue calculado empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = [1 - (A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco muestra}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

Donde A_{control} es la absorbancia del control (DPPH sin muestra), A_{muestra} es la absorbancia del DPPH mas la muestra, y $A_{\text{blanco muestra}}$ es la absorbancia solo de la muestra (muestra sin DPPH).

El Contenido Polifenólico Total (CPT) fue estimado por el ensayo Folin & Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965). Se utilizaron 500 μ L de cada extracto adicionándole 2,5 mL de reactivo Folin & Ciocalteu diluido (1:10). Después de 8 minutos, se añadieron 2,0 mL de carbonato sódico (7,5%) se vortea y se espera 1 hora a que se complete la reacción a temperatura ambiente y midió la absorbancia a 765 nm. Acido gálico (0-500 mg/L) fue empleado como estándar para elaborar una curva de calibración. Los resultados son expresados como equivalentes de ácido gálico (GAE/g de peso seco liofilizado de microalga, calculándose la media \pm (SD) ($n = 3$).

ANÁLISIS DEL TAMAÑO CELULAR (FSC), COMPLEJIDAD CELULAR O GRANULARIDAD (SSC) Y AUTOFLUORESCENCIA (Cla), POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo permite determinar un elevado número de funciones celulares a gran velocidad, utilizando una amplia variedad de moléculas bioquímicamente específicas, no tóxicas y fluorescentes, en condiciones muy cercanas al estado in vivo en exposiciones no prolongadas a niveles de luz muy elevados. El tiempo de aceleración en un citómetro y el paso de la célula frente al haz de luz del láser se produce en unas fracciones de segundo, de modo que el proceso de medida ejerce una influencia mínima sobre las células. Además la citometría de flujo ofrece un estadística más fiable que el estudio al microscopio.

Para el análisis de estos 3 parámetros celulares en *Phaeodactylum tricornutum* (**AIPt4=ALGAL, AARPt4, AEPA4, 8 y 16**) e *Isochrysis galbana* var. T-iso (**AITISO4=ALGAL, AARTISO4, ADHA4, 8 y 16**) se fijaron ($n=3$) muestras celulares de 1 mL con 100µL de la formulación hecha con paraformaldehído (PFA) y glutaraldehído (P+G) (1%P+0,05%G final); posteriormente se ultracongelaron a -50°C. La fijación facilita la entrada de los fluorocromos que tiñen los ácidos nucleicos (Bullock and Petruzc, 1989). Vaulot *et al.*,1989 sugieren la utilización de glutaraldehído al 1% y Premazzi *et al.*,1989 desarrollaron un protocolo con paraformaldehído (libre de metanol) entre 0,1 y 0,5%. Por lo que Troussellier *et al.*,1995 realizan un comparativo, concluyendo que el PFA o formalina es mejor que el glutaraldehído, tanto para la permeabilización celular (facilitando una posterior tinción) como para un mejor mantenimiento de la fluorescencia. Además el PFA no modifica las características de tamaño celular. Las muestras se pincharon en un citómetro FACScan Becton-Dickinson, con el programa de análisis LYSIS II de la misma marca: La fuente de luz que empleo este fotómetro es un láser de ión argón, que emite a 488 nm (luz azul).

Cuando la célula pasa frente al haz de láser en el citómetro de flujo produce una señal con una intensidad determinada; esta señal es detectada por un fotosensor que la convierte en un pulso electrónico cuya amplitud es proporcional a la intensidad de la señal. El pulso se procesa a través de amplificadores logarítmicos. El amplificador logarítmico convierte la amplitud de la señal en su logaritmo. En cada caso la amplitud del pulso se mide en voltios y se convierten en un número canal, que varía entre 0 y 1023, para una resolución de 1024 canales. Este número canal es proporcional al logaritmo de la señal. El pico-canal se corresponde con el canal en el que aparece la moda de la distribución de datos en cada caso. El tamaño celular se detecta en función de la luz refractada en un ángulo $<25^\circ$, lo que se conoce como luz refractada en el ángulo anterior ("forward Light scatter" o FSC). La granularidad celular se detecta en función de la luz refractada en un ángulo $>68^\circ$, que es lo que se denomina luz refractada lateralmente ("side Light scatter" o SSC).

Dado que la mayoría de las microalgas marinas unicelulares presentan generalmente una fluorescencia natural muy fuerte, la autofluorescencia es la que corresponde con la señal emitida por las clorofilas y pigmentos relacionados tras ser excitadas a 488 nm; la emisión

fluorescente captada es la que se encuentra por encima de los 645 nm (FL4). La evaluación de las células realizó en torno a las 10,000 y 15,000 unidades, lo nos da una gran capacidad de medidas multiparamétricas y gran tamaño de la población analizada.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para el análisis de los datos de incorporación y efecto unitario de los elementos sobre la generación de biomasa y composición bioquímica de las microalgas; evaluación poblacional, modificación bioquímica e incorporación de elementos unitarios en Artemia y rotíferos; efecto de los medios de cultivo sobre la generación de biomasa, supervivencia, composición bioquímica, e incorporación elemental de las microalgas, Artemia y rotíferos; Capacidad Antioxidante; Contenido de Polifenoles Totales en microalgas; Tamaño Celular, Complejidad Celular o Granularidad y Autofluorescencia, se realizaron análisis exploratorios, con apoyo de los paquetes estadísticos **SIGMA STAT 3.1** para Windows XP® y **SIGMA PLOT 11.0** con la finalidad de reconocer si la distribución de cada una de las variables cumplía los requisitos de Normalidad (*prueba de Kolmogorov-Smirnov*) y Homocedasticidad (*prueba de Bartlett*).

Dependiendo del ajuste de los datos a una función de densidad normal ($\mu=0$, $SD=1$), se estableció un Análisis de Varianza Paramétrico de una o dos vías (ANOVA I o II), o bien alternativamente el Análisis no Paramétrico (prueba de Kruskal-Wallis (Sokal and Rohlf, 1995). De igual forma se procedió con la igualdad o diferencia de varianzas. Siempre que el ANOVA (Paramétrico o no Paramétrico) proporciono diferencias significativas (0,05), muy significativas (0,01), o altamente significativas (0,001), se procedió a realizar una prueba *a posteriori* mediante el criterio de TUKEY, considerando en todo momento un nivel de significancia ($\alpha=0,05$) y un nivel de confianza ($1-\alpha=0,95$).

Descripción de las especies utilizadas

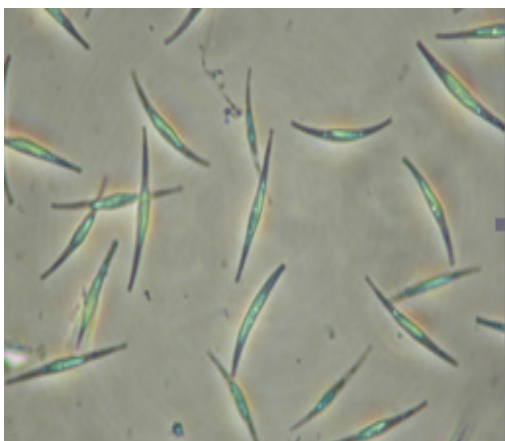
***Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin)**

Figura 5. *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin) 40x

relación con las Chrysophyceae. Características como la ausencia de movimiento y la ausencia de rafe muestran que esta especie pudiese considerarse como una Chrysococcalian muy primitiva. Las células de esta diatomea, que anteriormente fue descrita como *Nitzschia closterium* W. Sm forma *minutissima* (Allen y Nelson, 1910; Werner 1977), presentan dos morfotipos descriptivos: fusiforme y oval (Gutenbrunner *et al.*; 1994). En condiciones especiales puede formar cadenas. El morfotipo fusiforme carece de pared silíceas, mientras que el morfotipo oval presenta una sola valva silíceas por individuo. El morfotipo oval que se obtiene a partir del fusiforme mediante sucesivas resiembras en medio sólido, un distintivo más de estas es que las células pueden presentar movimiento, apareciendo en aglomeraciones mucilaginosas.

Cada célula contiene dos cloroplastos, un núcleo simple, varias mitocondrias, cuerpos de Golgi, retículo endoplasmático y ribosomas (Chiapelli *et al.*; 1979). Posee forma de uso, con tamaño celular que oscila entre 8 y 12 μm de longitud y de 1 a 2 μm de diámetro. Es frecuente observar membranas en número de 4 alrededor del cloroplasto. Existe presencia en la membrana de tres tilacoides por lámina, con interconexiones entre láminas y conexiones con el retículo endoplasmático. No existen almidones en el cloroplasto, por lo que las sustancias de reserva son los lípidos y leucosina (Weber, 1971). Los pigmentos presentes en esta microalga son: clorofilas a, c_1 , y c_2 , además de β -carotenos, fucoxantina, neofucoxantina, diadinoxantina (Stauber and Jeffrey, 1988, Domínguez, 1999). A diferencia de otras diatomeas no posee carotenoides menores ni clorofila c_3 (Weber, 1971., Jorgensen, 1977, Chiapelli *et al.*; 1979, Jeffrey and Stauber, 1985, Roy, 1988, Wright, *et al.*; 1991).

Las diatomeas son microalgas unicelulares fotosintéticas abundantes en el fitoplancton, que son de particular importancia en los ecosistemas oceánicos. Se cree que son responsable de hasta un 25% de la productividad primaria global y en consecuencia de una producción de significativa de O_2 (Montsant *et al.*, 2005, Oudot-Le Secq *et al.*, 2007, Kroth *et al.*, 2008). Estos microorganismos pueden producir grandes cantidades de biomasa; se estima que son responsables de alrededor del 20% de la fijación de carbono mundial. Hasta 16 gigatoneladas de carbono orgánico producido por el fitoplancton marino al año, o

Phaeodactylum tricornutum (Bohlin) pertenece al Phylum Chrysophyta, Clase Bacillariophyceae (Volkman *et al.*; 1981), orden Pennales, Suborden Raphidineae, Familia Phaeodactylaceae) (Lewin, 1958) presenta al igual que el resto de las especies pertenecientes a su *phylum*, cromatóforos dorado-marrones. Sin embargo existen características que difieren del resto de las diatomeas. La falta de estructuras silíceas en las formas pennadas y la presencia de leucosina indicaría una

aproximadamente un tercio de la producción total oceánica, se cree se hunden en el océano previniendo la re-entrada de este carbono en la atmósfera durante siglos (Kroth *et al.*, 2008).

Es una especie muy estudiada utilizada como modelo ecológico, fisiológico, bioquímico, biología molecular y fotosintéticamente hablando (Apt *et al.*, 1996), almacena una gran cantidad de lípidos como fuente y producción de grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados dentro de los cuales destaca el ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3 EPA) de entre varias estudiadas (Yongmanitchai and Ward, 1991, 1992; Mirón *et al.*, 2002) cantidad que además puede ser potenciada biotecnológicamente (Acien Fernandez, 2000; Fernández Sevilla, 2004; Ceron García, 2005), además de su potencial uso en farmacéutica industrial (Domergue *et al.*, 2002, 2003) El empleo de esta microalga en acuicultura es muy controversial debido a que las condiciones de cultivo pueden causar variaciones muy importantes en la composición bioquímica de las células y, por tanto, en su valor nutricional (Reis *et al.*, 1996; Albentosa *et al.*, 1996; Bitaubé Pérez *et al.*, 2008). En *P. tricornutum* los ácidos grasos constituyen entre el 8 y el 10% de la biomasa celular, donde el EPA constituye entre el 27 y el 30% de los ácidos grasos totales, o 2,6-3,1% de la biomasa seca (Atalah *et al.*, 2007). Importante la aplicación del EPA que produce en biotecnología, farmacéutica (producción exopolisacáridos de alto peso molecular así como superóxido dismutasas) (Guzmán Murillo *et al.*, 2007), producción de biodiesel por su riqueza en lípidos (especialmente PUFAs n-3) y de desarrollos larvales tempranos de organismos acuáticos (Harwood and Guschina, 2009)

La especie empleada, fue aislada de aguas de la Ria de Arosa (Fábregas, 1982) predominante del tipo fusiforme, por carecer de pared silicea

***Isochrysis galbana* var T-iso**



Figura 6.- *Isochrysis galbana* var. T-iso. 40x

Pertence a la Division Prymnesiophyta, Clase Prymnesiophyceae=Haptophyta (Edvarsen *et al.*, 2000), Orden Isochrysidales, Familia Isochrysidaceae, Género *Isochrysis*. Se conocen unos 50 géneros y aproximadamente 500 especies de primnesiófitas (Green *et al.*, 1990), pero constantemente se descubren nuevas especies. Las primnesiófitas pueden medir hasta 30 µm de diámetro pero la mayoría de las especies tienen un tamaño comprendido entre 2 y 20 µm (Jeffrey and Veski,

1997). Son de color amarillo-marrón, presentan variedad de formas, pudiendo ser esféricas, ovaladas, elipsoidales, fusiformes o aplanadas (Heimdal, 1993) (figura 6). La mayoría son de vida libre, móviles, cocoides o palmeloides, pero también las hay formadoras de colonias y filamentos (Green *et al.*, 1990). Casi todas las primnesiófitas son marinas aunque existen algunas especies de agua dulce. Algunas presentan reproducción sexual con alternancia de fases haploides y diploides (Gayral and Fresnel, 1983; Green *et al.*, 1990). Algunas formas

filamentosas sus células divídense dando 8 o 16 células flageladas que se dispersan para dar lugar a nuevos filamentos (Green and Parke, 1975).

Las células están recubiertas de escamas que pueden estar o no calcificadas; especies que presentan placas calcificadas cocolitos se denominan cocolitofóridos. Las escamas están compuestas de polisacáridos y proteínas que se producen en el complejo de Golgi, liberándose en la superficie de la célula mediante la fusión de la vesícula que las contienen con la membrana plasmática (Klaveness and Paasche, 1979; Hibberd, 1981; Romanovicz, 1981).

Presentan uno o dos cloroplastos periféricos con lámelas formadas por tres tilacoides y sin lámela periférica. El pirenoide está en el interior del plasto o formando un abultamiento en su superficie. Los cloroplastos están rodeados por una membrana del retículo endoplásmico que también incluye al núcleo. Los pigmentos principales de las primnesiófitas son la clorofila *a*, *c*₁, *c*₂ y *c*₃, así como β,β -caroteno, fucoxantina, diatoxantina y diadinoxantina (Jeffrey and Wright, 1994). Las primnesiófitas acumulan crisolaminarina y glóbulos lipídicos como sustancias de reserva. El género *Isochrysis* comprende especies con dimensiones de 3 μm \times 5 μm (Brown *et al.*, 1997) que presentan escamas únicamente en el haptonema.

Es una especie de gran interés por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados donde destaca por su concentración el ácido docosahexaenoico (DHA 22:6), lo que posibilita su utilización como fuente alternativa de DHA en dietas y salud humana por su acción antiinflamatoria (Burguess *et al.*, 1993; Coupland *et al.*, 1996) y como biomasa directa útil en desarrollos larvales tempranos de organismos acuáticos (Tzovenis *et al.*, 2003a,b), biotecnología, farmacéutica, producción de biodiesel por su riqueza en lípidos (especialmente PUFAs n-3) (Harwood and Guschina, 2009). Tal microalga por el perfil de PUFAs n-3, es una dieta importante de presas vivas tales como *Artemia* (Zhukova *et al.*, 1998; Evjemo *et al.*, 2000; Lora-Vilchis *et al.*, 2004; Seixas *et al.*, 2008; Hamre and Harboe, 2008), rotíferos (Takeyama *et al.*, 1996; Olsen *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2008) y copépodos aportándoles a estos últimos un máximo de producción y fecundidad de huevos y desarrollo de nauplios, copepoditos y adultos (Milione and Zeng, 2007). El factor nutricional del alimento o presa viva es fundamental para el mejoramiento de la larvicultura de organismos acuáticos; lo que incrementaría las tasas de supervivencia y previsibilidad de producción en la etapa de destete de peces marinos (Makridis *et al.*, 2009). *Isochrysis galbana* var T-iso es una de las principales especies utilizadas en los laboratorios de desarrollo larval (Borowitzka 1997) y en el cultivo de bivalvos en el mundo (Duerr *et al.*, 1998; Andersen and Ringvold 2000; Farías *et al.*, 2003, Pennarun *et al.*, 2003).

La cepa utilizada de *Isochrysis galbana* var T-iso (CCMP1324) procede del Provasoli-Guillard Center for the Culture of Marine Phytoplankton (CCMP) Bigelow, Maine, USA.

***Brachionus plicatilis* O. F. Müller**

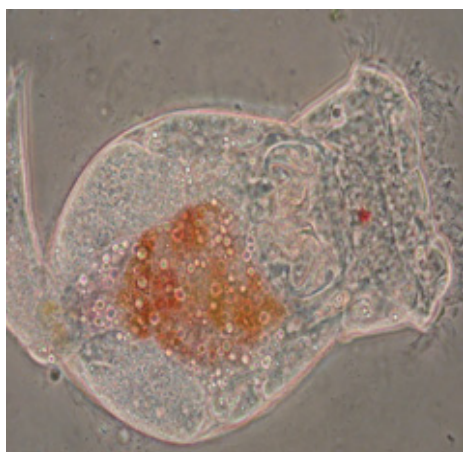


Figura 7.- *Brachionus plicatilis*

Los rotíferos son organismos microinvertebrados; y representan los más pequeños metazoarios pseudocelomados no segmentados. El nombre de rotífero se deriva de la presencia (en la mayoría de las especies) de una corona ciliada, que al moverse se asemeja a una rueda (del latín *rota*: rueda; *ferre*: transportador) (Wallace and Snell, 1991) (figura 7). Estos organismos son habitantes de ambientes acuáticos y semiterrestres, que pueden ser sésiles o libres nadadores. Pertenecen al *Phyllum* Aschelmintha, Rotífera o Rotatoria, Clase Rotífera o Monogononta, Suborden Ploima, Superfamilia Brachionoidea, Familia Brachionidae, Género *Brachionus*, Especie *plicatilis*. Comprende cerca de 2.000 especies no segmentadas, simétricamente bilaterales, pseudocelomados (Wallace and Snell, 1991), con una talla que oscila entre 100 µm y 1 mm, la talla difiere de acuerdo al lugar que habita, los cambios medioambientales y nutricionales son los que provocan diferencias morfológicas no genéticas originándose los ecofenotipos (Walker, 1981, Snell and Carrillo, 1984). *Brachionus plicatilis* es una especie nadadora con un tamaño alrededor de 240 µm de largo y 170 µm de ancho en estado adulto (Serra *et al.*, 1998)

El orden Monogononta se han encontrado machos en el 10% de las especies que lo conforman y se presume existen en todas las restantes, aunque la presencia de machos es cíclica y estacional en la mayoría de las especies. Los organismos de este orden presentan dimorfismo sexual, los machos tienen varios grados de reducción en algunas estructuras. El tamaño de los machos es mucho menor al de las hembras pudiendo llegar a ser desde la décima parte hasta la mitad de la talla de las hembras. El sistema digestivo de los machos es reducido y carecen de ano y cloaca. En cuanto a las hembras existen míticas, amíticas, y anfotéricas. Las míticas se reproducen sexualmente, las amíticas asexualmente o partenogenéticamente y las anfoteritas pueden reproducirse sexual o asexualmente. Los organismos de este *phylum* son cosmopolitas; habitan aguas salobres, con influencia marina y continental. Son osmorreguladores (59 a 936 mOsn), politérmicos, y presentan un amplio rango de tolerancia a los parámetros ambientales. Tolera un amplio rango de condiciones ambientales; salinidades que van de 1-97 g/L, tolera una alcalinidad 10 a 14000 meq/L.

El cuerpo de *Brachionus plicatilis* es más o menos cilíndrico o con forma de saco dividido en tres porciones: cabeza, tronco, y el pie (región postanal). La cabeza soporta la corona, la cual está rodeada por cilios que utiliza para las funciones de locomoción y alimentación, posee también una faringe muscular, el mástax, el cual posee un juego de mandíbulas duras llamadas *trophy* (Ruttner-Kolisko, 1974). Es una especie no selectiva en sus hábitos alimenticios; filtrador de materia orgánica particulada en la columna de agua

además de otras especies planctónicas. Su dieta incluye algas verde-azules, verdes rojas, bacterias y levaduras que presenten tamaños entre 12 y 15 μm a las cuales atrae por medio de los movimientos de la corona ciliar (Ito, 1957, 1960; Hirayama *et al.*, 1973; Ruttnner-Kolisko, 1974; Chontiyaputta e Hirayama, 1978; Fulks and Main 1992). La cantidad de alimento consumida por día equivale a más de cuatro veces su peso, con una asimilación del 19,4%; es muy eficiente en la conversión de la energía metabólica en energía para la reproducción (Koste, 1980). En el orden Monogononta existen dos tipos de hembras, míticas y amíticas. Ambos tipos son diploides ($2n$) y morfológicamente similares, pero producen diferentes tipos de huevos (Thane, 1974).

Las hembras amíticas producen huevos que solo forman un cuerpo polar durante el desarrollo del oocito; el proceso de maduración es amniótico y produce huevos diploides ($2n$), mismos que al desarrollarse producen nuevas hembras partenogenéticas. Por otra parte las hembras míticas producen huevos haploides mediante divisiones meióticas y en el proceso de maduración de las células germinales se producen cuerpos polares. Si estos huevos no son fertilizados se desarrollan machos; si son fertilizados se forman quistes de resistencia los que pasan por proceso de diapausa por lapsos distintos (dependiendo de las condiciones ambientales), y se desarrollan hembras amíticas (King, 1977). Las hembras amíticas tienen una producción máxima de 23 a 24 huevos en su ciclo de vida; en condiciones óptimas, una hembra puede cargar 5 huevos al mismo tiempo. Si se diluye el medio de cultivo se puede provocar un gran incremento en el número de huevos por puesta. Ito 1955; 1957, fue el primero en reportar que el rotífero *Brachionus plicatilis* podría ser utilizado como alimento de larvas de peces marinos y estableció las condiciones para su cultivo, utilizando como alimento a *Chlorella* sp. Las especies del género *Brachionus* más utilizadas en acuicultura son: *Brachionus plicatilis* y *B. rubens* ya que poseen un buen tamaño de presa para numerosos depredadores y ser de fácil digestión en diversas etapas tempranas de desarrollo larval de peces marinos, larvas de ostras (Shin *et al.*, 2008), erizos y otras sp marinas (Fontaine and Revera, 1980).

La calidad nutricional de la especie como alimento de diversos depredadores depende directamente del alimento o enriquecedor con que haya sido cultivado (Stottrup and Attramadal, 1992, Mourente *et al.*, 1995, Fernández *et al.*, 2008) y la función fisiológica hacia donde se dirija este en los desarrollos larvales tempranos de especies acuáticas (Souto *et al.*, 2008); así como del tamaño de partícula de la dieta (Baer *et al.*, 2008).

Brachionus plicatilis se utiliza rutinariamente en maricultura, los cuales alimentan a mas de 60 especies de peces marinos y 18 especies de crustáceos. Sin embargo, es útil sólo si es nutritivo, de tamaño adecuado, y de crecimiento rápido (Sayegh *et al.*, 2007).

Las larvas de peces marinos requieren cierta cantidad de ácidos de cadena larga, como son los ácidos grasos altamente insaturados (PUFA's) de la serie n-3 como el ácido araquidónico (AA, 20:4), ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5), ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6) que son los óptimos para la supervivencia y crecimiento. Las fuentes más comunes de estos ácidos grasos esenciales son: tradicionalmente aceites de pescado comercial (por los productos de la pesca pelágica),

los aceites ricos en DHA / EPA, y eucariotas unicelulares, como dinoflagelados heterótrofos y prymnesiophyceas fototróficas que bioencapsulados y enlongados por *Brachionus plicatilis* son fácilmente aprovechados por el siguiente nivel trófico (Estudillo-del Castillo *et al.*, 2009).

Los peces marinos requieren de alimento vivo en sus primeras etapas de vida para la supervivencia y desarrollo. El papel de la alimentación exógena en las primeras etapas es controvertido. Las larvas de peces marinos sólo tienen un tracto digestivo parcialmente desarrollado después de la eclosión por lo que dependen fuertemente de las enzimas exógenas proporcionadas por el alimento vivo que consumen para la digestión de sus presas. La mayoría de los cultivos larvales, se basan en el suministro de rotíferos durante los 10 y 30 días después de la apertura de la boca de las larvas. Los rotíferos son una fuente de alimentación adecuada por las siguientes razones: su forma, tamaño y color, su motilidad relativamente lenta, su contenido bioquímico el que pueden ser manipulados para satisfacer los requisitos nutricionales de las larvas de peces, y la facilidad con la que pueden ser cultivados en altas densidades para ser proporcionados en las grandes cantidades necesarias.

Por otra parte, los rotíferos pueden servir como una bio-cápsula o vehículo para la transferencia de agentes terapéuticos, bacterias probióticas y minerales para las larvas de peces (Lubzens, *et al.*, 2001).

Los niveles de minerales y oligoelementos, con excepción del calcio, magnesio y hierro, son muy bajos en los rotíferos que en los copépodos. Sin embargo el magnesio a pesar de estar presente no se encuentra en las concentraciones adecuadas para cubrir los requisitos de estadios tempranos de peces marinos; como sucede con la no presencia de selenio, yodo entre otros, que son necesarios para procesos de metamorfosis, antioxidantes y enzimáticos en larvas de peces (Hamre *et al.*, 2008, Rider *et al.*, 2009).

***Artemia franciscana* (Kellogg, 1906)**



Figura 8.- *Artemia franciscana*

cópula (figura 8).

Artemia es un pequeño artrópodo incluido en la Clase Crustácea Entomostrácea, perteneciente a la subclase Branquiópoda, orden Anostraca, familia Artemiidae y género *Artemia*. Los Anostrácos son crustáceos muy antiguos que han sobrevivido en la actualidad, por lo que es común encontrar características primitivas en ellos como: gran cantidad de segmentos corporales, ausencia de artejos articulados en las extremidades, mezclados con otros caracteres propios de un alto grado de especialización como apéndices para la filtración de partículas en suspensión y antenas en los machos especializadas para el proceso de

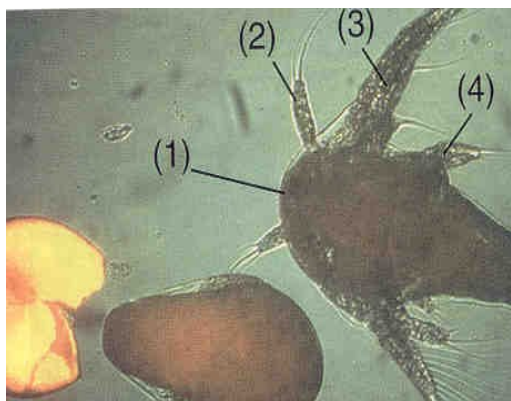


Figura 9. Estadío umbrellita y nauplio instar I.
(1) ojo naupliar; (2) anténula; (3) antenas;
(4) mandíbula.

Artemia habita lagos y lagunas hipersalinas caracterizados por una baja diversidad de especies. Una peculiaridad del género es la producción de quistes flotantes. Los quistes son metabólicamente inactivos y no se desarrollan mientras permanezcan secos. En contacto con el agua, los quistes se hidratan y el embrión contenido dentro, inicia su metabolismo; a las 20 h inicia el rompimiento del quiste. Mientras el embrión arrastra el quiste vacío (etapa umbrellita; figura 9), termina el desarrollo del embrión y, después de un corto tiempo, ocurre la eclosión culminando con la

aparición del nauplio. El primer estadio naupliar (instar I; 400-500 μ m de longitud) posee un color parduzco, un ojo naupliar rojo en la región cefálica y tres pares de apéndices (figura 9).

La larva instar I no se alimenta ya que su sistema digestivo todavía no es funcional. Después de 8 horas el organismo muda al segundo estadio naupliar (instar II) en el cual ya es fitoplanctófago. El crecimiento de la larva continúa con otras 15 mudas que se agrupan en estadios metanaupliar, postmetanaupliar y postlarvarios. La *Artemia* adulta (\pm 1 cm de longitud) tiene un cuerpo alargado con dos ojos pedunculados complejos, un tracto digestivo lineal, anténulas sensoriales y 11 pares de toracópodos funcionales (figura 8). Posee 11 somitos torácicos con toracópodos también nombrados filópodos, los cuales están seguidos de dos somitos modificados, en los cuales se encuentran los órganos reproductores que normalmente se consideran como parte del tórax; en las hembras adultas se observan dos pequeños sacos translúcidos donde se aprecian los quistes o pequeños huevecillos. Al somito genital le siguen 7 abdominales sin apéndices; el telson termina en una furca compuesta por un par de cercopoditos. Los apéndices torácicos típicos, cuyo tamaño va disminuyendo hacia la parte posterior, tienen un eje principal llamado "corno", un exopodito conocido con el nombre de "flabellum" y un endopodito. Los apéndices torácicos cumplen una triple función: i) sirven como órganos natatorios, ii) permiten la respiración por intercambio de gases y iii) filtran el agua para atrapar partículas alimenticias. El tamaño corporal varía según la raza pero en general parece estar relacionado con el nivel de ploidía.

La importancia para la acuicultura que *Artemia* sp. posee es ampliamente reconocida desde los años 20's entre los técnicos y científicos de todo el mundo (Sorgeloos, 1979; Jones and Houde, 1981; Hontoria *et al.*, 1989; Rosenberry, 1997; Lavens and Sorgeloos, 2000). Las razones de tal hecho son varias, entre las que se destaca su tiempo de almacenaje (Léger, *et al.*, 1987); su valor con respecto a ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs n-3) en estado naupliar o metanaupliar ya que es deficiente en particular del ácido graso docosaenoico (22:6 n-3 DHA) y sin poseer enriquecimiento el ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3 EPA) es aproximadamente el 5% (Han *et al.*, 2000), en tanto que los niveles de

ácido araquidónico (20:4 n-6 ARA) también suelen ser bajos, pero después de su enriquecimiento con emulsiones de aceites marinos en la forma de ácidos grasos ethyl ester o aceites intactos que contengan triacyl-sn- glicerol (Baker *et al.*, 1998; Ando *et al.*, 2004), ARA podrá superar el 2% (Hamre and Horboe 2008). En los peces marinos el ácido araquidónico es el sustrato preferido para la producción de eicosanoides; ya que la deficiencia en desaturasas impide la síntesis de ARA a partir del ácido linolénico dietético (Estévez *et al.*, 1999).

Así mismo microalgas con altos contenidos de HUFA's n-3 como suele contener *Isochrysis galbana* var. T-iso (Olsen *et al.*, 1997; Evjemo and Olsen, 1999; Evjemo *et al.*, 2000; Lora-Vilchis *et al.*, 2004) y que son estables en el transporte trófico, sin embargo es sabido que la composición de ácidos grasos de las microalgas suministradas como alimento en desarrollos larvales tempranos marinos y como alimento vivo varía significativamente dependiendo de la posición taxonómica de las especies, así como de las condiciones y medio de cultivo (Reitan *et al.*, 1994; Coutinho 2008; Seixas *et al.*, 2009, Ferreira *et al.*, 2009). *Phaeodactylum tricornutum* parece ser otra especie microalgal con gran potencial para enriquecimiento de *Artemia* debido a que es rica en lípidos polares donde destaca el ácido graso 20:5(n-3) y el 20:4(n-6) (Zhukova *et al.*, 1998).

El enriquecimiento con liposomas ha sido un éxito (Nordgreen *et al.*, 2007); en *Artemia* que a su vez funciona como bio-cápsula o vehículo para la transferencia de alimenticios esenciales, pigmentos, agentes terapéuticos y bacterias probióticas bajo ciertos modelos y estándares (Figueiredo *et al.*, 2009) que influyen positivamente en la supervivencia, crecimiento y pigmentación de las larvas de peces. Además de emplearse como atrayente organoléptico en conjunto con dietas inertes para alevines (Persoone, 1978; Levine, 1983). El empleo de *Artemia* sp. sigue vigente aun cuando existan productos alimenticios alternativos (biomasa viva, congelada, liofilizada, flakes, pellets, etc.) que intentan suplir los estándares nutricionales requeridos.

Un tópico muy de actualidad lo representa la nutrición mineral, la cual no se a estudiado muy afondo a pesar de saber que una gran cantidad de elementos están ligados a diversos procesos morfológicos, fisiológicos, de pigmentación entre otros; principalmente en etapas tempranas de desarrollo larval de organismos acuáticos.

Por ejemplo en la naturaleza, el zooplancton contiene un mayor contenido de Zn, Fe, Cu, S, Mg, Se, Si, Ca, Mn etc; que en la *Artemia* recién eclosionada (Nguyen *et al.*, 2008), es por ello que la incorporación directa en el zooplancton o en piensos de larvas de peces como Boosting (Rider *et al.*, 2009) o la incorporación vía la base de la cadena trófica es esencial; de forma que las larvas de distintas especies acuáticas dispongan de ellos y mejorar procesos de crecimiento, metamorfosis y supervivencia.

Capítulo 1

Estudio de la incorporación y efecto unitario de los elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en diferentes concentraciones, en el medio de cultivo "ALGAL" (Fábregas *et al.*, 1984), sobre la generación de biomasa y composición bioquímica de ***Phaeodactylum tricornutum*** (Bohlin) en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.

Introducción

El agua de mar es generalmente considerada como una fuente suficiente de minerales para la mayoría de los organismos marinos, pero es un medio intrínsecamente complejo, que contiene más de 50 elementos conocidos, además de un gran número, pero variable de compuestos orgánicos. Por lo general, es necesario enriquecer el agua de mar con nutrientes como el nitrógeno, fósforo y hierro (Barsanti and Gualtieri, 2006). En los sistemas intensivos de producción, los altos niveles de biomasa pueden conducir al agotamiento de los minerales esenciales. Watanabe *et al.*, 1983, en un análisis de los diversos componentes de la alimentación de estadios larvarios, consideró que los minerales no son un factor determinante para el valor de la dieta. Robin 1989 obtuvo un aumento significativo en el crecimiento de turbot, utilizando rotíferos enriquecidos con una premezcla de minerales. Hay poca información en la literatura acerca de los requisitos de minerales y elementos traza y aún menos sobre el efecto del contenido mineral de microalgas en las presas vivas (Lie *et al.*, 1997). El medio mineral utilizado para el cultivo de microalgas debe ser reconsiderado para optimizar el valor nutritivo a través de la cadena alimentaria. Cada microalga posee necesidades específicas minerales que han de ser cuidadosamente calculadas con respecto a la concentración óptima de nutrientes (Becker and Venkataraman, 1982, Fábregas *et al.*, 1985a, Fábregas and Herrero 1985, Fábregas *et al.*, 1986a, Fábregas *et al.*, 1986b, Garnham *et al.*, 1992; Andersen, 2005).

Diseño experimental

Se utilizó a la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* (aislada de aguas de la Ria de Arosa Fábregas, 1982) para cultivarla en régimen discontinuo y semicontinuo en minifotobiorreactores cilindro cónicos con 80 mL de volumen de cultivo. El medio de cultivo utilizado fue el denominado "ALGAL Industrial" desarrollado por Fábregas *et al.*, 1984; cuya composición y preparación se detalla en la tabla 1, tal medio de cultivo fue preparado en su totalidad con reactivos analíticos denominándole en lo sucesivo "Algal Analítico Industrial" (AAI) y preparado a una concentración de nitrógeno 4mM (NaNO_3). Posteriormente fueron preparadas soluciones 0, 0,1, 1,0, 10,0 y 100,0 mM (en el caso del Fe^{3+} se incluyó además la concentración 20,0 mM) de los siguientes elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} las cuales se añadieron por separado a la formulación de AAI; destacar que en el caso de los elementos Fe^{3+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} que son componentes de inicio en la formulación del AAI no fueron considerados en la preparación del mismo, para de ese modo poder probar las diferentes concentraciones de elementos.

Tabla 1.- Composición y preparación del "ALGAL ANALÍTICO INDUSTRIAL" (Fábregas et al., 1984)

"ALGAL ANALITICO INDUSTRIAL" 4 mM

Fábregas, J., Abalde, J., Herrero C., Cabezas, B., and Veiga, M. 1984. Growth of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. Aquaculture 42: 207-215.

SOLUCIÓN 1

Macro/microelementos	Concentración mM	Cantidad mg.L ⁻¹
ZnCl ₂	1,0	27,258
MnCl ₂ ·2H ₂ O	1,0	39,582
NaMoO ₄ ·H ₂ O	1,0	48,388
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,1	4,7586
CuSO ₄	0,1	3,1722

EDTA 374,0

Nota: disolver en 200 mL de agua destilada

SOLUCIÓN 2

C ₆ H ₅ FeO ₇ ·H ₂ O	20	1051,88
--	----	---------

Nota: disolver en 100 mL de agua destilada

SOLUCIÓN 3

Tiamina	7,0
Biotina	1,0
Cianocobalamina B ₁₂	0,6

Nota: disolver la tiamina en 98 mL de agua destilada acida (pH 4,5-5). Adicionar las otras vitaminas (Biotina y Cianocobalamina B₁₂)

SOLUCIÓN 4

NaNO ₃	2000	34,000
NaH ₂ PO ₄	100	2,400

Nota: disolver en 600 mL de agua destilada.

Las soluciones deberán ser autoclavadas y mezcladas en frío quedando las soluciones mezcladas en un volumen final de 1 Litro.

****** 10 mL de solución stock se adicionarán a 1L de agua de mar para quedar una concentración de NaNO₃ en 4 mM.

Los cultivos a diferentes concentraciones por elemento (tabla 2), se realizaron por triplicado, sometidos a fotoperiodos circadianos de 12:12 h (luz:oscuridad respectivamente) con una intensidad luminosa de $152,3 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; proporcionándoles un flujo de aireación continua de 250 mL.min^{-1} , suplementado con inyecciones de CO_2 de 10 segundos cada 10 minutos durante el período de luz, con el objeto de mantener el pH de los cultivos entre 7,5 y 8, además de proveer una fuente de carbono inorgánico.



Sistema de cultivo discontinuo y semicontinuo de *Phaeodactylum tricornutum*.

Se empleó una densidad inicial de $1,5 \times 10^6 \text{ células.mL}^{-1}$. Los cultivos se dejaron llegar hasta el final de la fase logarítmica. Se considero que alcanzó la fase estacionaria cuando la densidad celular en cultivo se mantuvo constante durante tres días consecutivos como mínimo, finalizando el cultivo discontinuo y evaluándose la biomasa generada.

Es en ese momento que se inicio el régimen semicontinuo de cultivo, el cual consistió en retirar o renovar diariamente a primera hora del ciclo de luz el 30% del cultivo (Fábregas *et al*; 1994, Fábregas *et al.*, 1995), substituyéndose por medio fresco; la tasa de renovación empleada fue en base a lo descrito por Otero 1994; Fábregas *et al*; 1995; 1998, Ferreira 2006, que resulta ser la mejor tasa productiva y bioquímicamente hablando. Se considero que alcanzó la fase de estabilización el cultivo semicontinuo, cuando la densidad celular en cultivo se mantuvo constante durante tres días consecutivos como mínimo finalizando el cultivo semicontinuo; evaluándose la biomasa generada y cosechándose de 5 a 10 mL de biomasa microalgal por centrifugación, para el análisis correspondiente de proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, incorporación de metales; y filtración de biomasa microalgal, para determinación de peso seco, cenizas y materia orgánica por célula de *Phaeodactylum tricornutum*.

Tabla 2.- Designación de los elementos incorporados en diferentes concentraciones, en la formulación del "ALGAL ANALITICO INDUSTRIAL", para el cultivo de *Phaeodactylum tricornutum* (n=3.condición)

ELEMENTOS								
[mM]	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Se^{2-}	Si^{4+}	Fe^{3+}	Zn^{2+}	Cu^{2+}	S^{2-}
0	Ca0	Mg0	Se0	Si0	Fe0	Zn0	Cu0	S0
0,1	Ca0,1	Mg0,1	Se0,1	Si0,1	Fe0,1	Zn0,1	Cu0,1	S0,1
1,0	Ca1,0	Mg1,0	Se1,0	Si1,0	Fe1,0	Zn1,0	Cu1,0	S1,0
10,0	Ca10,0	Mg10,0	Se10,0	Si10,0	Fe10,0	Zn10,0	Cu10,0	S10,0
100,0	Ca100,0	Mg100,0	Se100,0	Si100,0	Fe100,0	Zn100,0	Cu100,0	S100,0
20,0	---	---	---	---	Fe20,0	---	---	---

Resultados y discusión.

La densidad celular de los cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* sometidos a diferentes concentraciones de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} , una vez que llegaron a la fase estacionaria de crecimiento, mostraron que la mayor y menor biomasa celular en estado de equilibrio para cada elemento, al día 16-18 de cultivo discontinuo fue la siguiente:

Fe^{3+} : 100,0mM ($45,29 \pm 1,85$) y 0mM ($33,51 \pm 0,69 \times 10^6 \text{cel.mL}^{-1}$) (figura 1a)

S^{2-} : 10,0mM ($48,88 \pm 4,10$) y 0mM ($39,39 \pm 1,76 \times 10^6 \text{cel.mL}^{-1}$) (figura 1b)

Zn^{2+} : 100,0mM ($45,27 \pm 2,57$) y 0mM ($37,03 \pm 1,67 \times 10^6 \text{cel.mL}^{-1}$) (figura 1c)

Cu^{2+} : 1,0mM ($55,84 \pm 2,48$) y 100mM ($1,22 \pm 0,18 \times 10^6 \text{cel.mL}^{-1}$) (figura 1d)

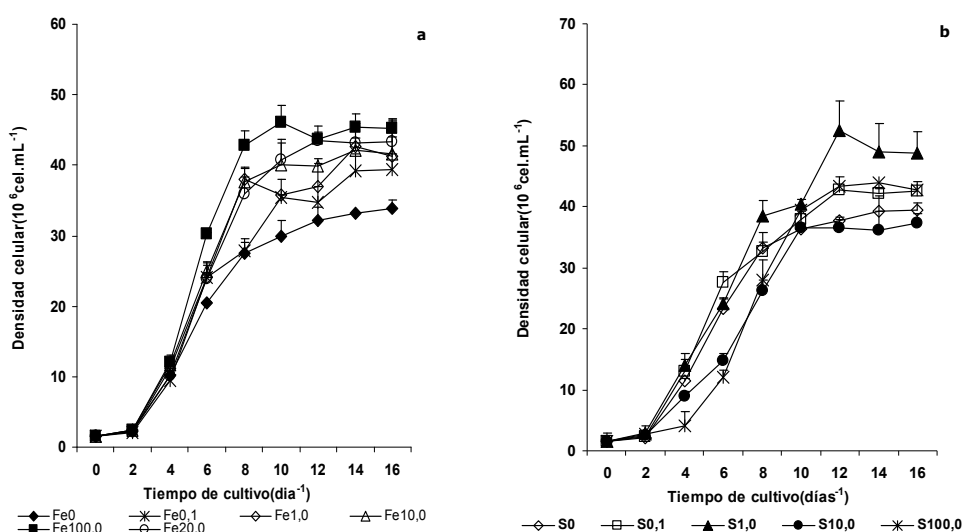


Figura 1.- Densidad celular *Phaeodactylum tricornutum* a diferentes concentraciones de: (a) Fe^{3+} , (b) S^{2-} . Cultivo discontinuo.

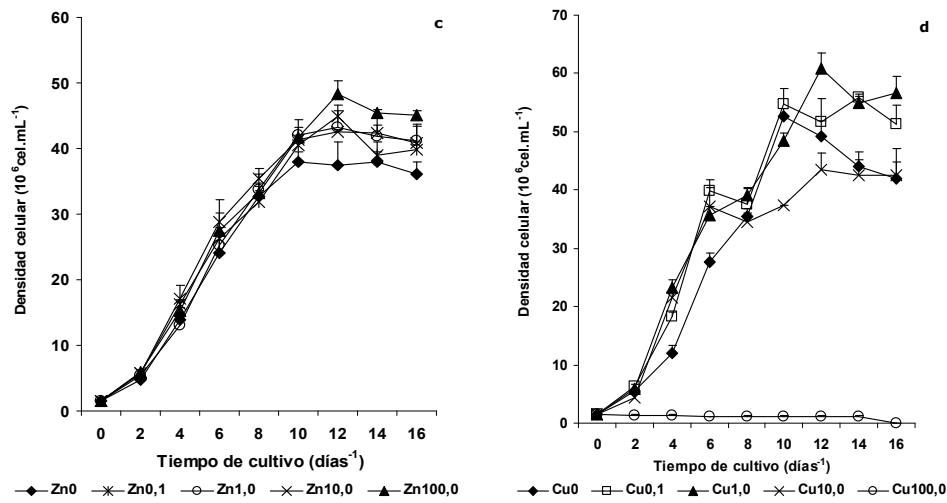


Figura 1.- Densidad celular *Phaeodactylum tricornutum* a diferentes concentraciones de: (c) Zn^{2+} , (d) Cu^{2+} . Cultivo discontinuo.

Mg^{2+} : 1,0mM ($50,81 \pm 1,59$) y 100mM ($43,69 \pm 1,88 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) (figura 3a)

Ca^{2+} : 10,0mM ($45,87 \pm 2,12$) y 0mM ($37,92 \pm 0,84 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) (figura 3b)

Si^{4+} : 10,0mM ($46,90 \pm 3,34$) y 0mM ($40,15 \pm 0,63 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) (figura 3c)

Se^{2-} : 10,0mM ($46,68 \pm 1,14$) y 0mM ($40,97 \pm 1,75 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) (Figura 3d)

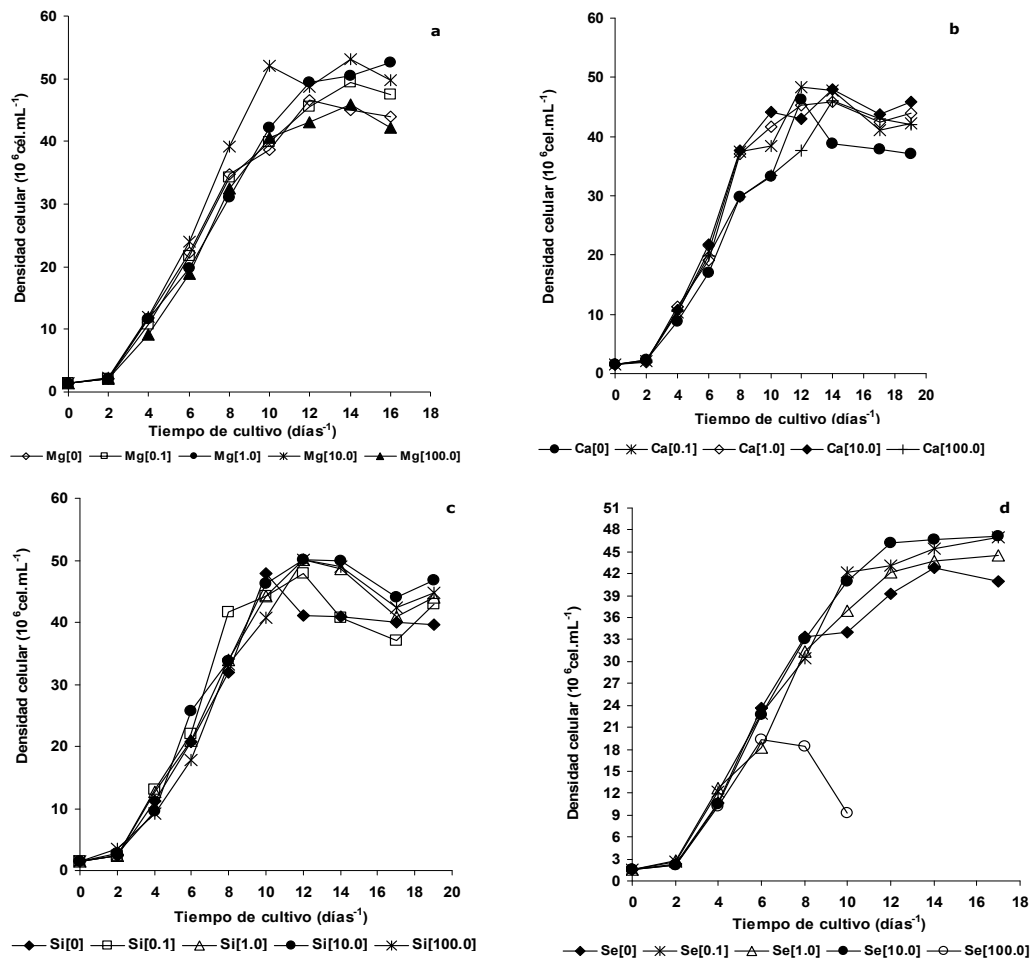


Figura 3.- Curvas de crecimiento para *Phaeodactylum tricornutum* a diferentes concentraciones de: **(a)** Mg^{2+} , **(b)** Ca^{2+} , **(c)** Si^{4+} , **(d)** Se^{2-} . Cultivo discontinuo.

Existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,002$) entre las condiciones de cultivo mencionadas ($p<0,05$) (figura 2a,b,c,d y figura 4a,b,c,d). Destacar que en el caso del Cu^{2+} la concentración 100 mM fue subletal, en tanto que para el Se^{2-} para la misma concentración mM fue letal, a partir del día 10 de cultivo. Los resultados medios de concentración celular de este estudio para todos los elementos fueron muy similares a los reportados por Otero, 1994, con la misma concentración 4mg át. N/L. Por lo que respecta a la concentración de los elementos Odum, 1971; Dempster and Sommerfeld 1995 mencionan que un factor limitante en el crecimiento microalgal es aquel recurso primordial que esta presente en cantidades que se aproximan estrechamente al mínimo crítico requerido por la célula y si el nivel del factor limitante aumenta, la población microalgal crecerá a una velocidad mucho mayor hasta que el nivel del recurso limite la tasa de crecimiento o produzca toxicidad (Bontje *et al.*, 2009). La mayoría de autores concluyen que la concentración de metales o elementos que afectan el crecimiento microalgal en gran medida es variable y depende de las especies utilizadas, la densidad celular, la composición del medio o las condiciones físicas del cultivo (Reed and Gadd 1990; Genter, 1996, Moreno-Garrido *et al.*, 2000; Stauber and Davies, 2000; Franklin *et al.*, 2002, Ronsón-Paulín *et al.*, 2004; Debelius *et al.*, 2009).

Se obtuvieron tasas máximas de crecimiento para el Fe^{3+} [1,0mM] de 2,35 div.día⁻¹, S^{2-} [0,1] de 2,45 div.día⁻¹, Zn^{2+} [10,0] de 1,58 div.día⁻¹, Cu^{2+} [10,0] de 2,29 div.día⁻¹ (tablas 3-6), en tanto que para el Mg^{2+} [0] de 2,44 div.día⁻¹, Ca^{2+} [1,0] de 2,50 div.día⁻¹, Si^{4+} [0,1] de 2,41 div.día⁻¹ y Se^{2-} [10,0] de 2,29 div.día⁻¹ (tablas 7-10)

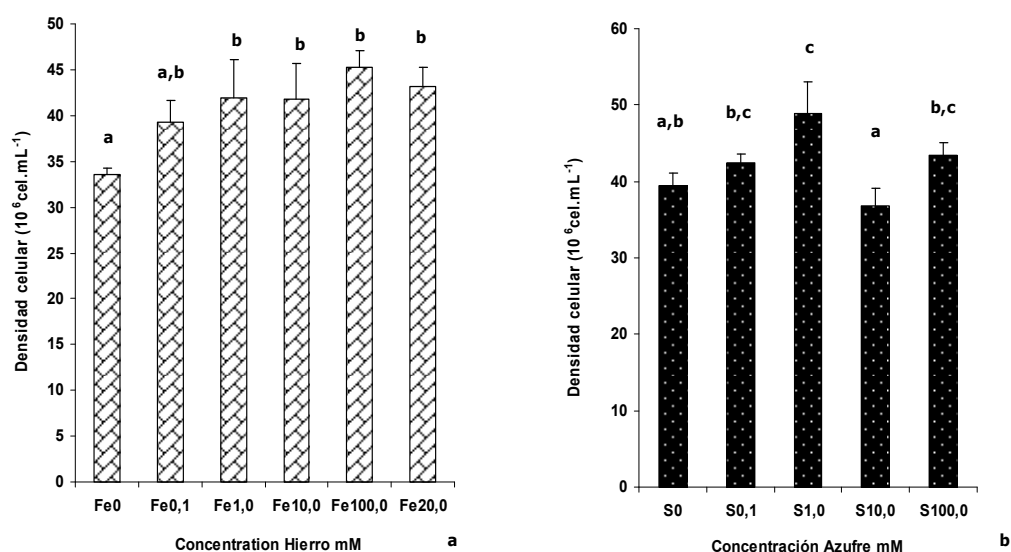


Figura 2.- Máxima densidad celular en cultivo discontinuo para *Phaeodactylum tricornutum* con diferente concentración de: **(a)** Fe^{3+} , **(b)** S^{2-} . Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

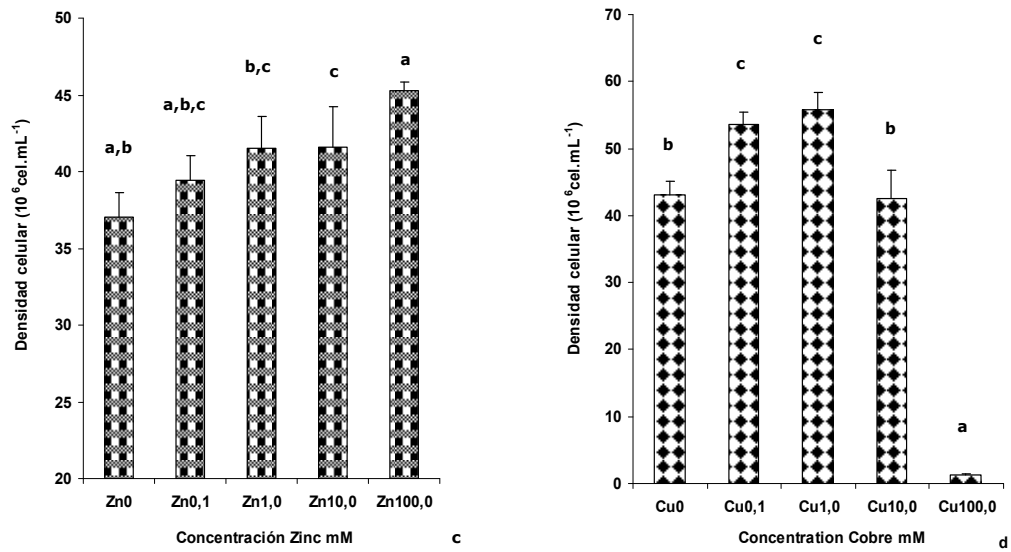


Figura 2. Máxima densidad celular en cultivo discontinuo para *Phaeodactylum tricornutum* con diferente concentración de: **(c)** Zn^{2+} , **(d)** Cu^{2+} . Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

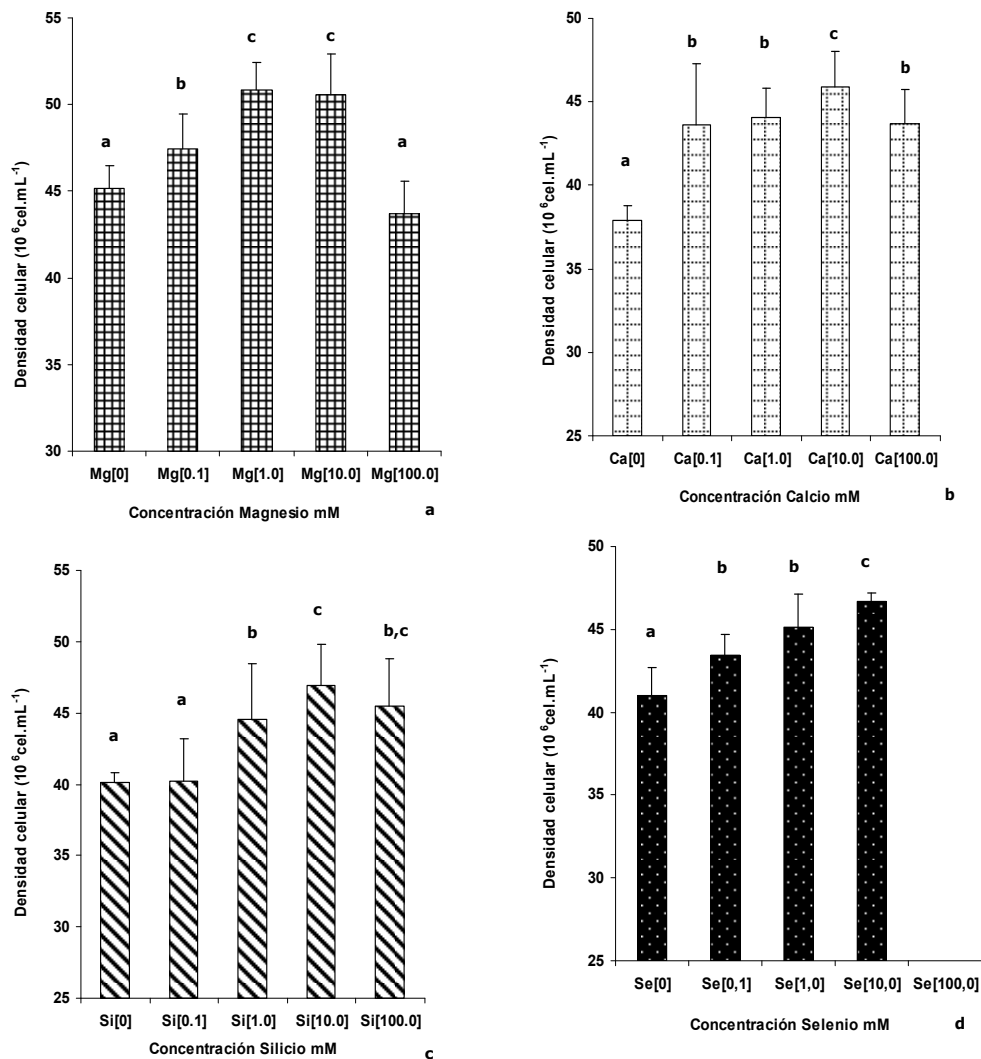


Figura 4.—Máxima densidad celular en cultivo discontinuo para *Phaeodactylum tricornutum* con diferente concentración de: **(a)** Mg^{2+} , **(b)** Ca^{2+} , **(c)** Si^{4+} , **(d)** Se^{2-} . Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

La generación de densidad celular en base a la concentración de los elementos ensayados, en cultivo discontinuo mostró las siguientes correlaciones r^2 (tabla 11): Fe^{3+} ($r^2=0,94$), S^{2-} ($r^2=0,84$), Cu^{2+} ($r^2=0,98$), Mg^{2+} ($r^2=0,85$), Ca^{2+} ($r^2=0,92$), Si^{4+} ($r^2=0,91$) las cuales se ajustaron a un tipo de tendencia polinomial, en tanto que el Zn^{2+} ($r^2=0,94$) y el Se^{2-} ($r^2=0,99$) se ajustaron a una tendencia lineal positiva. La tendencia polinomial demuestra que existe una concentración que optimiza la generación de biomasa celular, favoreciendo distintos procesos de la célula tanto fisiológicos como fotosintéticos; y que en concentraciones mayores al óptimo, dichos procesos disminuyen pudiendo causar incluso toxicidad como ocurrió con el Cu^{2+} que llegó a ser subletal. Por lo que respecta a los elementos que mostraron una tendencia lineal, la concentración óptima no se observó pudiendo asumir que las células pueden incorporar más del elemento sin ser letal pero fisiológicamente no cumplir su objetivo. Darley, 1987, menciona que es debido tal fenómeno a que en los diferentes medios de cultivo la presencia del ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) ayuda ya sea a incrementar la disponibilidad de los elementos presentes o disminuir los niveles tóxicos de los iones libres.

La densidad celular de estabilización en cultivo semicontinuo respecto al cultivo discontinuo para cada elemento no presentó diferencias con la tasa de renovación del 30%, excepto con las concentraciones 0, 0,1 del Fe^{3+} donde la densidad celular disminuyó cerca de un 90%, en el caso del S^{2-} disminución de más del 50% en 10,0 y 100mM, en el Zn^{2+} decremento mayor al 50% en 1,0, 10,0 y 100mM; alcanzando el estado de equilibrio al día 48, existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,002$) entre las concentraciones de cultivo ($p<0,05$)., los valores de correlación r^2 se mantuvieron casi constantes con respecto al cultivo discontinuo en la mayoría de los elementos excepto el Mg^{2+} , Ca^{2+} (tabla 11); presentando el siguiente comportamiento de mayor a menor densidad celular:

Fe^{3+} : 20,0mM ($48,50 \pm 3,42$) y 0mM ($1,97 \pm 0,18 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) (figura 5a).

S^{2-} : 0,1mM ($43,92 \pm 1,42$) y 100mM ($19,68 \pm 1,55 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) (figura 5b).

Zn^{2+} : 0,1mM ($43,00 \pm 2,27$) y 100mM ($16,28 \pm 1,53 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) (figura 5c).

Cu^{2+} : 0,1mM ($52,31 \pm 3,30$) y 0mM ($44,07 \pm 1,86 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) (figura 5d).

Los cultivos mostraron una productividad celular que fluctuó entre 0,59 y $14,55 \times 10^9 \text{ cél. L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ (Fe^{3+}), 5,90 y $13,18 \times 10^9 \text{ cél. L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ (S^{2-}), 13,22 y $15,69 \times 10^9 \text{ cél. L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ (Cu^{2+}), 4,88 y $12,90 \times 10^9 \text{ cél. L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ (Zn^{2+}) (tabla 3,4,5,6). Otero, 1994 con la misma diatomea tasa de renovación igual del 30%, y concentración 4 mg át.N/L obtuvo productividades de $12,7 \times 10^9 \text{ cel. L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ las cuales son inferiores a las reportadas en este estudio. Axler *et al.*, 1980, en experimentos de enriquecimiento demostraron que la productividad se intensifica al añadir al medio de cultivo Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mo^{6+} , Co^{3+} y Zn^{2+} aunque no menciona que concentraciones. La nutrición con elementos es un tema

complicado debido a que la concentración absoluta suele ser menos importante que la disponibilidad del elemento, lo cual puede ser afectado por cierto número de variables del cultivo. Es claro además, que el medio mineral facilita la producción de metabolitos secundarios, especialmente productos extracelulares (Sastre *et al.*, 2007).

El azufre es necesario en la división celular especialmente en las diatomeas; tanto en la división nuclear como citoplásmica, en la mayoría de las microalgas se incorpora en las proteínas, en lípidos, en forma de sulfolípidos y polisacáridos esterificados. Metabólicamente, formas activas de azufre como S-adenosyl metionina y adenosin-3'-fosfato-5'-fosfosulfato pueden encontrarse en las algas (O'Kelley, 1974).

El hierro es necesario en la oxidación biológica en microalgas. Tal elemento más el manganeso son importantes en la productividad y tasas fotosintética y respiratoria. Dropp 1961 ha señalado la importancia del potencial redox del medio marino en relación con el hierro, el cual tiene efecto importante sobre la absorción de hierro por diatomeas y microalgas marinas. El nivel de hierro en el medio de cultivo afecta la producción de clorofila, así como el crecimiento. Es parte esencial de algunas enzimas.

La mayoría de las microalgas requieren del zinc, deficiencia de este elemento produce bajas cantidades de RNA, pero cuando no existe deficiencia de él, existe un alto contenido de aminoácidos y DNA en las células, en ausencia de zinc desaparecen los ribosomas citoplasmáticos, por lo que juega un papel importante en la preservación de la estructura de los componentes ribosomales (Schuster and Broda, 1970).

Todas las microalgas requieren del cobre como micronutriente. Una de las bases metabólicas de este requisito es su papel en la fotosíntesis para la formación de plastocianina. Existe además como parte de las proteínas en el aparato fotosintético. Elevadas concentración de cobre en suma con la intensidad de luz y otros iones en exceso como el hierro, inhiben la fotosíntesis, división y concentración celular. El pH es un factor de toxicidad de este elemento por encima de 8 y por debajo de 5 (O'Kelley, 1974).

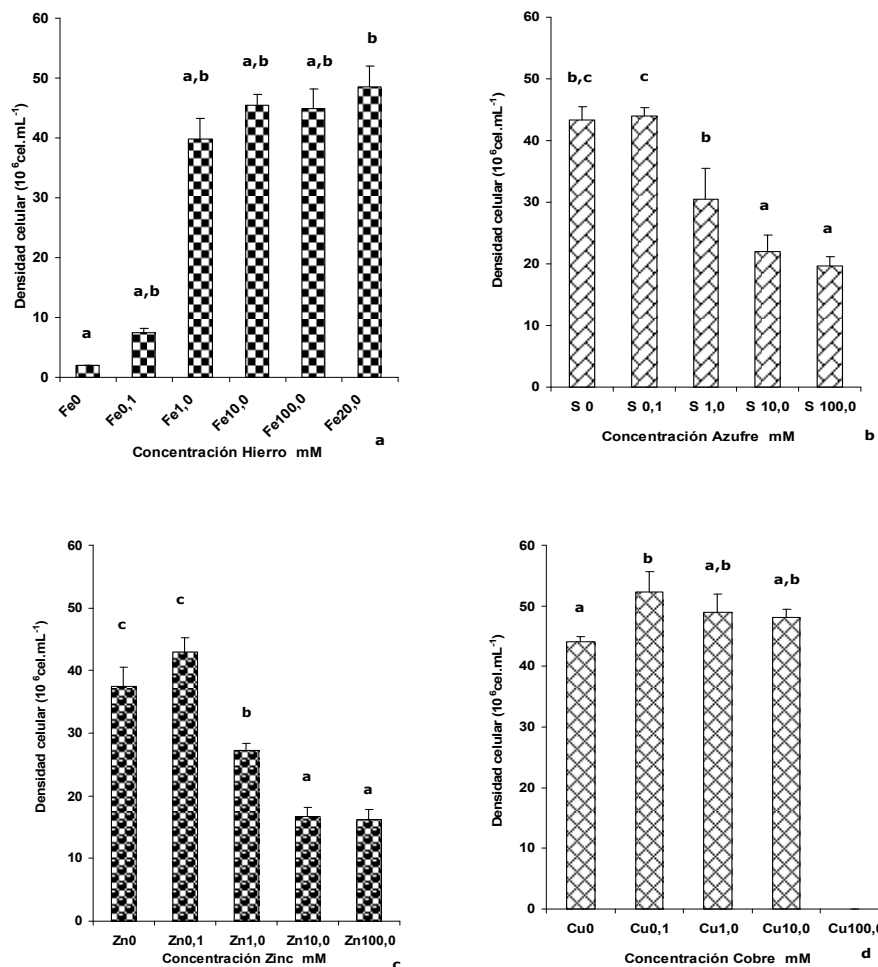


Figura 5.- Máxima densidad celular en cultivo semicontinuo para *Phaeodactylum tricornutum* con diferente concentración de: **(a)** Fe^{3+} , **(b)** S^{2-} , **(c)** Zn^{2+} , **(d)** Cu^{2+} . Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

En el caso del Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , la densidad celular de estabilización al día 47 de cultivo en semicontinuo y con respecto al cultivo discontinuo disminuyó en todas las concentraciones al 50%, obteniendo los siguientes valores de mayor a menor densidad celular donde existieron diferencias significativas ($p=0,002$) entre las concentraciones de cultivo ($p<0,05$):

Mg^{2+} : 1,0mM ($24,26 \pm 1,89$) y 0mM ($18,20 \pm 1,63 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) (figura 6a)

Ca^{2+} : 1,0mM ($24,64 \pm 2,23$) y 0mM ($18,46 \pm 1,96 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) (figura 6b)

Si^{4+} : 1,0mM ($22,88 \pm 1,32$) y 0mM ($19,22 \pm 1,31 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) (figura 6c)

Se^{2-} : 1,0mM ($22,40 \pm 1,60$) y 0mM ($18,07 \pm 0,94 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) (Figura 6d)

Mostrando una productividad celular que fluctuó entre $5,46$ y $7,28 \times 10^9 \text{ cél. L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ (Mg^{2+}), $5,53$ y $7,39 \times 10^9 \text{ cél. L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ (Ca^{2+}), $5,76$ y $6,86 \times 10^9 \text{ cél. L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ (Si^{4+}), $5,42$ y $6,36 \times 10^9 \text{ cél. L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ (Se^{2-}) (tabla 7,8,9,10). Estas productividades fueron inferiores a las reportadas por Otero, 1994 en similar concentración de nitrógeno y tasa de renovación que este estudio.

Existe investigación que conduce a determinar el óptimo mineral en la composición del medio de crecimiento en varias especies microalgales. Evidentemente, la mayoría de las formulaciones de los medios de cultivo son muy diferentes de lo que las microalgas tienen en su ambiente natural, así mismo para las concentraciones de todos los elementos necesarios y que por lo general superan por mucho sus niveles naturales. Estas altas concentraciones de nutrientes son bien toleradas por la mayoría de las especies. Es así, sobre todo en cultivos discontinuos en laboratorio, donde la densidad celular aumenta varias veces sin un cambio de medio, es así que la alta concentración de nutrientes limita la posibilidad para el desarrollo de una deficiencia de algún elemento mineral (Kaplan *et al.*, 1990).

En la producción de la biomasa microalgal en reactores cuidadosamente controlados, es fácil el acceso de las células a todos los minerales necesarios para su desarrollo y máximo crecimiento. En tales condiciones resulta imprescindible determinar, para cada especie, el rango de concentración óptima para cada mineral y si es necesario adicionar alguno más.

El magnesio es crucial en el funcionamiento del metabolismo celular, su ausencia modifica el metabolismo del nitrógeno alterándolo, además de limitar la acumulación temporal de carbohidratos y síntesis de proteínas. Probablemente, la mayor parte del Mg en la mayoría de las células está involucrado en la agregación de los ribosomas en unidades funcionales. El Mg funciona en las reacciones que implican la transferencia de "alta energía" de grupos fosfato y como componente de la clorofila (Healy, 1973).

Requerimientos de calcio para la máxima división y crecimiento celular se ha demostrado para las algas verdes, las cianobacterias, y diatomeas (Gerloff and Fishbeck, 1969; Kylin and Das, 1967). Si bien la función del Ca sigue siendo en gran parte desconocida, está implicado en la deposición calcárea y esqueletos de varias microalgas marinas ya que forma parte importante de la pared celular, además de estar relacionada con algunos procesos enzimáticos. En general, de los elementos requeridos en cantidades relativamente grandes al menos en algunas microalgas, el Ca parece ser el menos comprendido funcionalmente (Kaplan *et al.*, 1990).

La captación de Si depende de procesos energéticos. La absorción de silicio parece estar confinada a la parte del ciclo de división celular inmediatamente anterior a la separación de células, durante el cual la pared celular está presente lo que sugiere que el proceso de transporte está estrechamente relacionado con la deposición de la pared. El Si es un requisito específico para la síntesis de proteínas, ADN, RNA, clorofila, xantofilas, y lípidos, así como la fotosíntesis (O'Kelley, 1974, Kaplan *et al.*, 1990; Legrand *et al.*, 1991).

El selenio desempeña un papel que no está claro en la alimentación microalgal y toxicidad. Estimula la división y crecimiento celular en algunas microalgas marinas, diatomeas, así como algunos dinoflagelados de agua dulce y cianobacterias (McKeown and Mariñas 1986; Kaplan *et al.*, 1990; Frankerberger and Benson 1994; Li *et al.*, 2003).

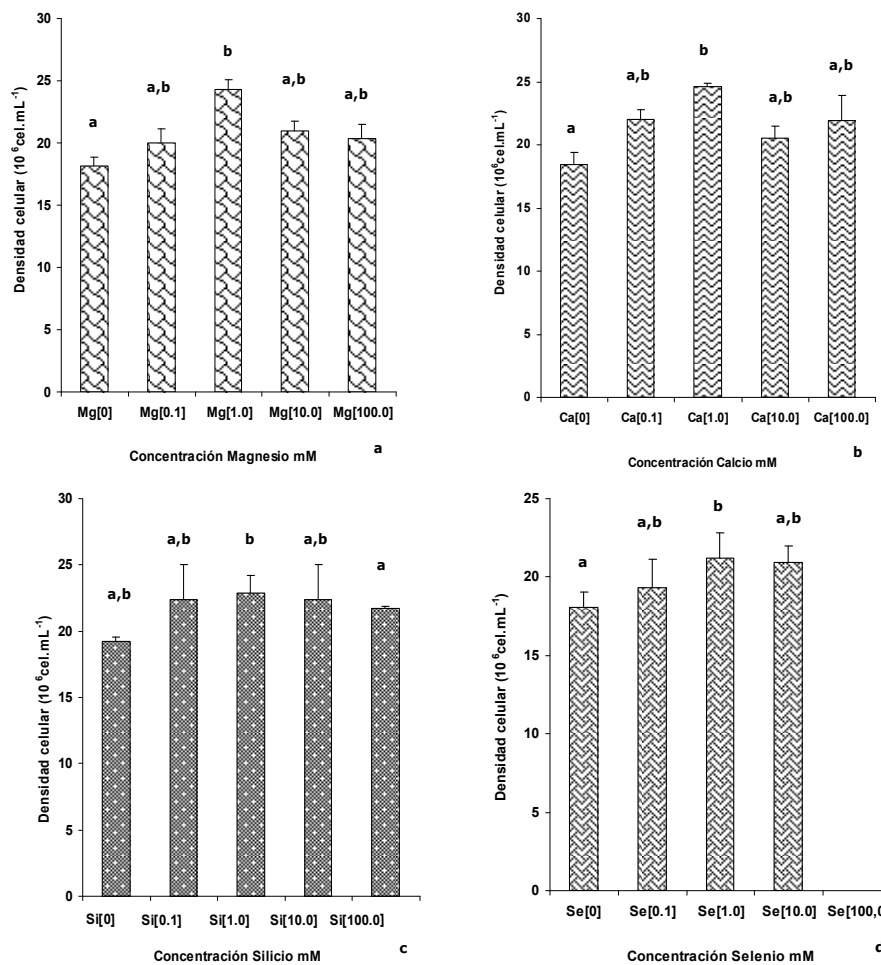


Figura 6.- Máxima densidad celular en cultivo semicontinuo para *Phaeodactylum tricornutum* con diferente concentración de: **(a)** Mg^{2+} , **(b)** Ca^{2+} , **(c)** Si^{4+} , **(d)** Se^{2-} . Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

Es en base a lo anteriormente expuesto que los macro y micro minerales a menudo actúan como activadores e inhibidores enzimáticos, no es de extrañar en base a nuestros resultados que su efecto es más marcado en la tasa de crecimiento en lugar de rendimiento total dada la concentración de estos. La distinción entre la concentración que afecta el rendimiento y la tasa de crecimiento es importante. Diversos autores han demostrado una relación inversa entre la inhibición del crecimiento por una sustancia tóxica y el suministro de nutrientes (Braek *et al.*, 1980). Este efecto puede ser en parte indirecto, debido a los nutrientes inducida por los cambios fisiológicos en la célula. En el crecimiento exponencial de las células en general, ocupan los metales a un ritmo mayor que las células en fase estacionaria de crecimiento. Cuando los efectos directos se han observado a menudo es difícil determinar si las interacciones son verdaderamente fisiológicas o alteraciones químicas del metal (o nutrientes) en disponibilidad en el medio.

Se cuantifico la cantidad de nitrógeno residual, al final de la etapa de estabilización de los cultivos en semicontinuo, donde para el caso del Mg^{2+} fluctuó entre 2,26 y 2,58mM;

Ca^{2+} 2,17 y 3,32mM; Si^{4+} 2,12 y 2,87mM; Se^{2-} 2,60 y 2,81mM (tabla 7-10); en tanto que para el Fe^{3+} oscilo entre 0 y 2,43mM; S^{2-} 0 y 2,10mM; Zn^{2+} 0,06 y 1,91mM y Cu^{2+} 0mM (tabla 3-6). La fluctuación del nitrógeno (N) residual entre las concentraciones de los elementos ensayados, correspondió con la densidad celular generada (tablas 3-10), es decir a mayor densidad celular menor cantidad de nitrógeno residual o mejor dicho conversión de nitrato en nitrógeno intracelular (Otero, 1994, Otero *et al.*, 1998) esto indica que en algunos casos existió limitación por nitrógeno en la concentración óptima de los elementos en el crecimiento microalgal; y que concentraciones del elemento por encima del óptimo ejercen un subaprovechamiento o punto de saturación del nitrógeno; debido al descenso de densidad celular a causa de la concentración del elemento ensayado, hasta comportarse de manera letal como fue el caso del Se^{2-} [100,0mM] y Cu^{2+} [100,0mM], lo que nos indicaría en este punto una función complementaria toxica entre la concentración de nitrógeno residual y la concentración del elemento no óptima.

Situación que coincide con la mayor cuota celular de nitrógeno Q_N y carbono Q_C (pg.cel^{-1}), para la [mM] óptima de todos los elementos ensayados, existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,002$) entre las concentraciones de cultivo ($p<0,05$): Fe^{3+} [20,0](1,28-9,77), S^{2-} [0,1](1,02-7,60), Zn^{2+} [0,1](1,22-8,02), Cu^{2+} [0,1](1,35-8,74), (tablas 3-6); Mg^{2+} [1,0](0,97-7,44), Ca^{2+} [1,0](0,96-7,33), Si^{4+} [1,0](0,97-7,63), Se^{2-} [1,0](0,88-6,53) (tablas 3-10). Los valores máximos de Q_N reportados en este estudio con algunos de los elementos son muy similares a los reportados por Otero, 1994 con la misma especie de diatomea, en tanto que otros autores como Osborne and Geider, 1986; Thompson *et al.*, 1990 han descrito valores por encima de los óptimos aquí reportados, con la diferencia de que ellos emplearon concentraciones más altas de nitrógeno en sus estudios con respecto al nuestro.

Se observó que la relación C:N descendió con las concentraciones optimas de todos los elementos (figuras 7 a-h) existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,002$) entre las concentraciones de cultivo ($p<0,05$), pudiendo ser tomado como un indicador de limitación por nitrógeno (Laws and Bannister, 1980) y no por concentración del elemento; que coincide con los máximos de densidad celular.

La relación C:N posterior al optimo se estabiliza en todos los casos entre 6 y 7 (figuras 7a-h). Los anteriores valores son \geq a los reportados por Osborne and Geider, 1986., para la misma especie de diatomea; con respecto a la relación Redfield (C:N 6,6) cuando no existe limitación por nutrientes (Goldman *et al.*, 1979; Goldman and Peavey, 1979, Goldman *et al.*, 1986) indicando la proximidad de la máxima tasa de crecimiento (McCarthy, 1980). Otero, 1994; Otero *et al.*, 1998, para la misma diatomea con una tasa de renovación del 30% y una concentración 4mM de nitrógeno obtuvieron valores inferiores a 6,6 en estabilización de C:N. Los máximos valores de C:N producto de la concentración óptima de los elementos ensayados en el presente estudio, fueron incluso mejores que los descritos por Parsons *et al.*, 1961, en cultivos discontinuos con valores de C:N de 7,5.

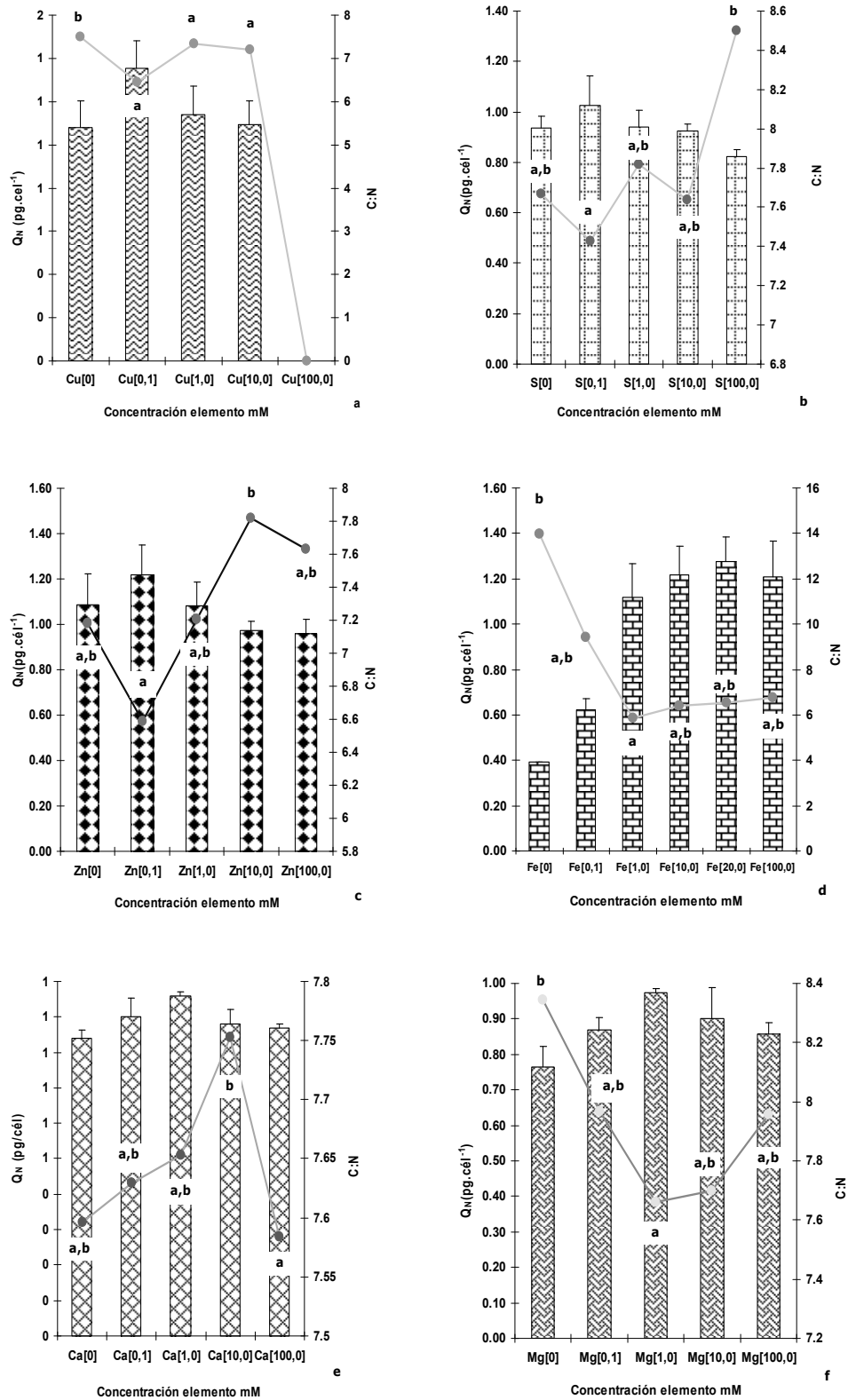


Figura 7.- Evolución de la cuota celular de nitrógeno Q_N y de la relación C:N respecto la concentración de elementos en *P. tricornutum*: **(a)** Fe^{3+} , **(b)** S^{2-} , **(c)** Zn^{2+} , **(d)** Cu^{2+} , **(e)** Mg^{2+} , **(f)** Ca^{2+} . Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

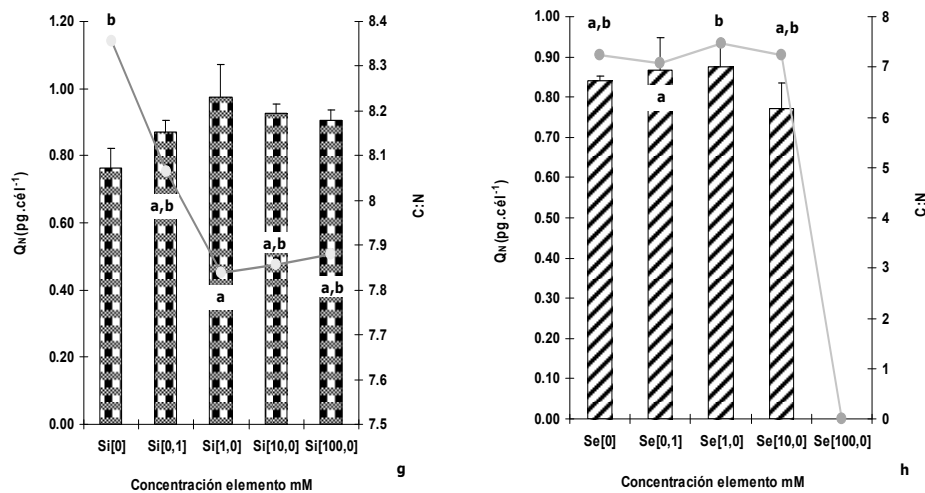
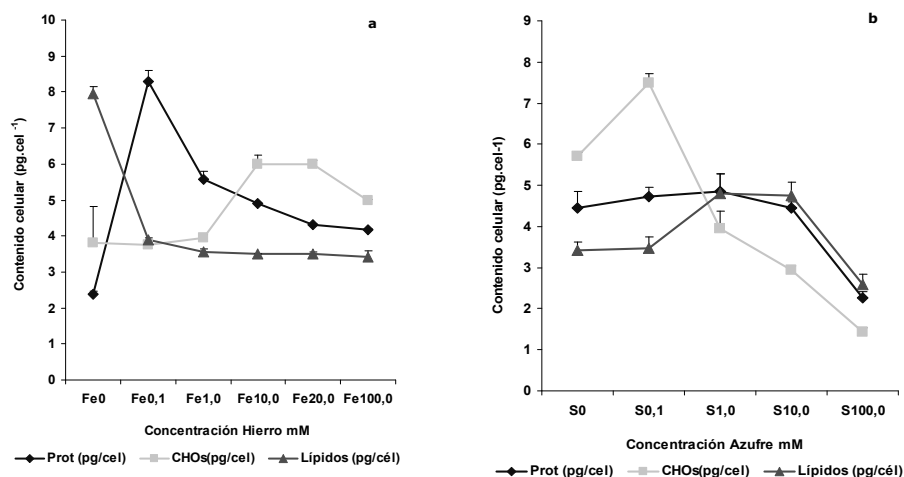


Figura 7.- Evolución de la cuota celular de nitrógeno Q_N y de la relación C:N respecto la concentración de elementos *P. tricornutum*: **(g)** Si^{4+} , **(h)** Se^{2-} . Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

La composición bioquímica celular (proteínas, carbohidratos y lípidos) de *Phaeodactylum tricornutum*, varío ampliamente con respecto al elemento y concentración [mM], existiendo en los tres combustibles bioquímicos diferencias altamente significativas ($p=0,002$) entre las condiciones de cultivo ($p<0,05$) (Tabla 3-10). La mayoría de los elementos (excepto Fe^{3+} y S^{2-}) mostraron un mayor contenido proteico celular derivado de Q_N (tablas 3-10), con coeficientes de correlación con tendencia negativa (r^2 variables entre elementos, en el rango de 0,66 y 0,94) con respecto a los lípidos (r^2 entre 0,76 y 0,96) y estos con respecto a los carbohidratos (r^2 entre 0,67 y 0,96) (tabla 11); con diferentes comportamientos hiperbólicos positivos y negativos (figuras 8a-h). El contenido proteico celular máximo, dado de la concentración óptima de los elementos experimentados solo coincidió con el S^{2-} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , aunque en la mayoría de los casos mostraron valores superiores (pg.cél $^{-1}$) a lo reportado por diferentes autores; 4,81 pg.cél $^{-1}$ (Fernández Reiríz *et al.*, 1989), 5,21 pg.cél $^{-1}$ (Herrero, *et al.*, 1991), 7,17 pg.cél $^{-1}$ (Parsons *et al.*, 1961) y 7,75 pg.cél $^{-1}$ por Otero, 1994 para una concentración de nitrógeno 4mM. La mayoría de los elementos experimentados posee una amplia implicación en la síntesis de proteínas como mencionan varios autores (O'Kelley, 1974; McCarthy, 1980; Kaplan *et al.*, 1990) aunque ninguno especifica concentraciones óptimas de estos en la formulación de los medios de cultivo.



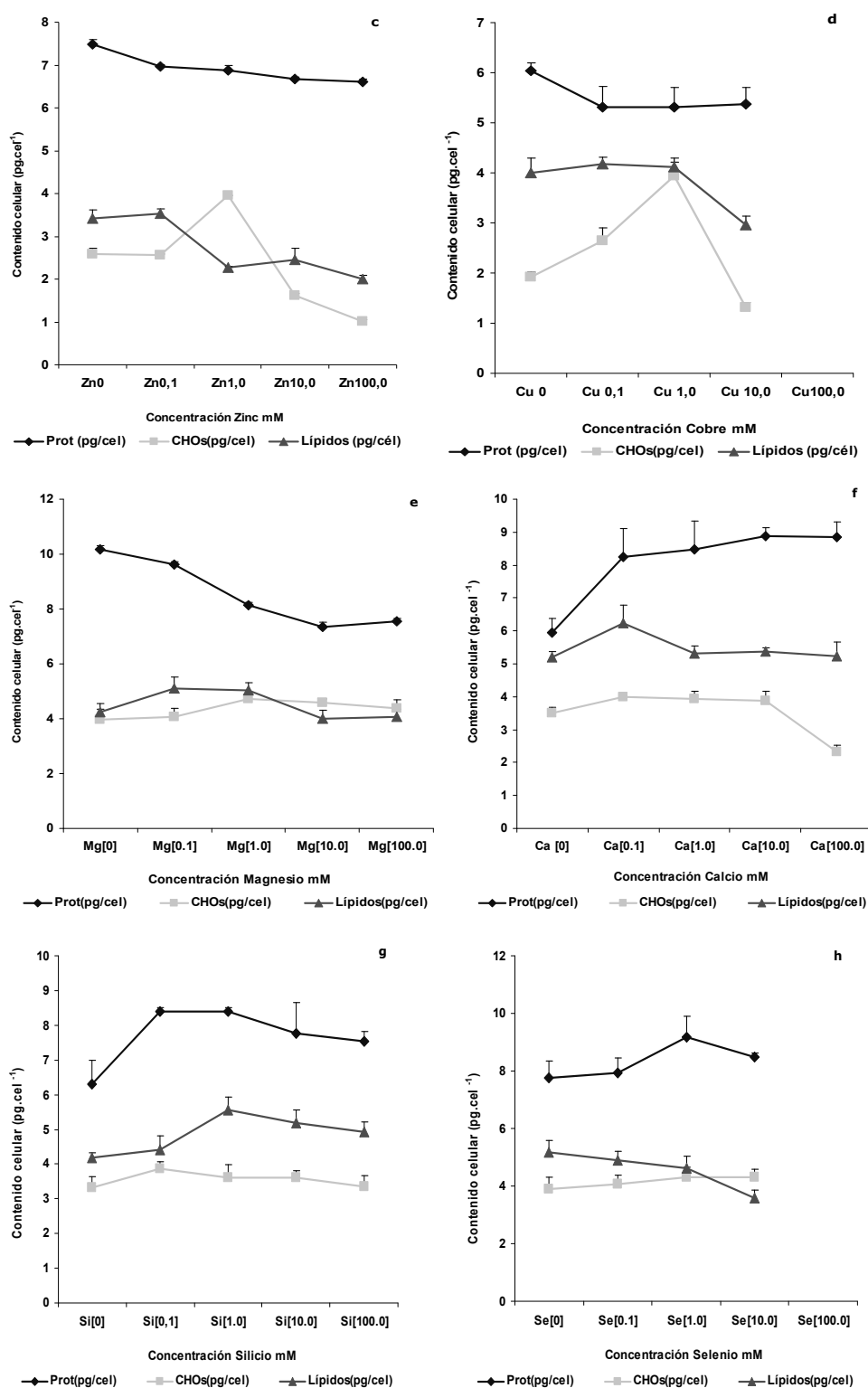


Figura 8.- Contenido celular (pg.cel^{-1}) de proteínas, carbohidratos y lípidos, respecto la concentración de elementos en *P. tricornutum*: **(a)** Fe^{3+} , **(b)** S^{2-} , **(c)** Zn^{2+} , **(d)** Cu^{2+} , **(e)** Mg^{2+} , **(f)** Ca^{2+} , **(g)** Si^{4+} , **(h)** Se^{2-} . Media \pm SD ($n=3$).

Se ha sugerido que los aminoácidos libres, una fracción importante desde el punto de vista del valor nutricional proteico de las microalgas, sirven como almacenamiento de

nitrógeno en las diatomeas, proponiéndose al contenido en aminoácidos libres como indicador del estado nutricional celular (Admiraal *et al.*, 1986). El papel de los aminoácidos libres como almacenadores de nitrógeno ha sido demostrado en otras especies microalgales (Dortch *et al.*, 1984; Davidson *et al.*, 1992), incluyendo diatomeas (Dortch, 1982).

El segundo combustible bioquímico, mayormente almacenado en la célula independientemente del elemento ensayado, fueron los lípidos, los cuales se acumularon preferentemente conforme existió un óptimo de concentración del elemento en la mayoría de los casos (*figura 8 a-h*) y que coincidió con un agotamiento o disminución del nitrógeno residual (*tabla 3-10*) en el medio de cultivo, situación que concuerda con lo reportado por Terry *et al.*, 1985 para la misma diatomea y otras más como *Nitzschia communis* (Dempster and Sommerfeld 1995). Se obtuvo un contenido lipídico máximo con respecto al óptimo de los elementos estudiados los cuales fluctuaron entre 3,4 y 5,5 pg.cel^{-1} (*tabla 3-10*), valores superiores a los reportados por Parsons *et al.*, 1961; Fernández Reiríz *et al.*, 1989; Otero 1994. Kates and Volcani, 1996 mencionan que aun cuando sea alta la producción de lípidos no necesariamente inducirá buenas concentraciones de EPA intracelular.

Por último los carbohidratos celulares igual que los lípidos demostraron el mismo comportamiento con la mayoría de los elementos (*figura 8 a-h*) en el rango de 2,57 y 7,5 pg.cel^{-1} . Es así que Otero 1994 y Otero *et al.*, 1998 demostraron que tanto lípidos como carbohidratos desde el punto de vista energético son utilizados como fuentes de almacenamiento, bajo limitación de nitrógeno, lo cual fue coadyuvado en este estudio con la óptima concentración de los elementos experimentados. Por lo tanto son evidentes, las diferencias existentes en la composición bioquímica, lo que nos da una idea de la versatilidad de la actividad metabólica celular vía la concentración de ciertos elementos, los cuales poseen acusada implicación en la síntesis de proteínas, lípidos y carbohidratos, además de otros metabolitos intermedios (O'Kelley, 1974; McCarthy, 1980; Kaplan *et al.*, 1990; Ronsón-Paulín *et al.*, 2004).

Cuando el contenido de proteína se considera como porcentaje de la fracción orgánica, el valor de proteína según la concentración del elemento fluctuó entre el 16 y 55% como es el caso del Fe^{3+} y del 52 al 68% en el Zn^{2+} ; en tanto que para el S^{2-} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} y Se^{2-} osciló entre 30 y 55% (*figura 9 a-h*). Por lo que respecta al porcentaje de lípidos, elementos como el Fe^{3+} presentaron un comportamiento hiperbólico negativo conforme a su concentración, decreciendo de 56 al 25%; mismo comportamiento lo presentaron el Ca^{2+} y Se^{2-} decreciendo de 35 al 21%. En tanto que con el S^{2-} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Si^{4+} mostraron un comportamiento hiperbólico positivo incrementándose en un rango entre 21 y 41 %. En el caso de los carbohidratos el Fe^{3+} reveló un comportamiento de incremento entre el 26 al 44%, situación inversa ocurrió con el S^{2-} con un decremento entre el 41 al 22 %, así como el Ca^{2+} y Si^{4+} entre el 24 y 14%. En tanto que el Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} y Se^{2-} expresaron un comportamiento hiperbólico positivo (*figuras 9 a-h, tablas 3-10*).

El valor calórico celular para el Fe^{3+} y Zn^{2+} decreció con la concentración de estos, pero en el caso del S^{2-} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} y Se^{2-} nos mostró una tendencia hiperbólica positiva (tabla 3-10), con una tasa de renovación del 30%. Al respecto Otero, 1994 con *Phaeodactylum tricornutum* describe comportamientos que decrecen con diferentes tasas de renovación experimentadas, lo cual concluye es debido al contenido orgánico celular y no a la composición bioquímica de estas. Más sin embargo tales comportamientos en nuestro estudio son debidos a la evolución que sigue el peso orgánico celular en base a la concentración de los elementos experimentados y que son debidos a la necesidad fisiológica celular ya descrita (O'Kelley, 1974; McCarthy, 1980; Kaplan et al., 1990).

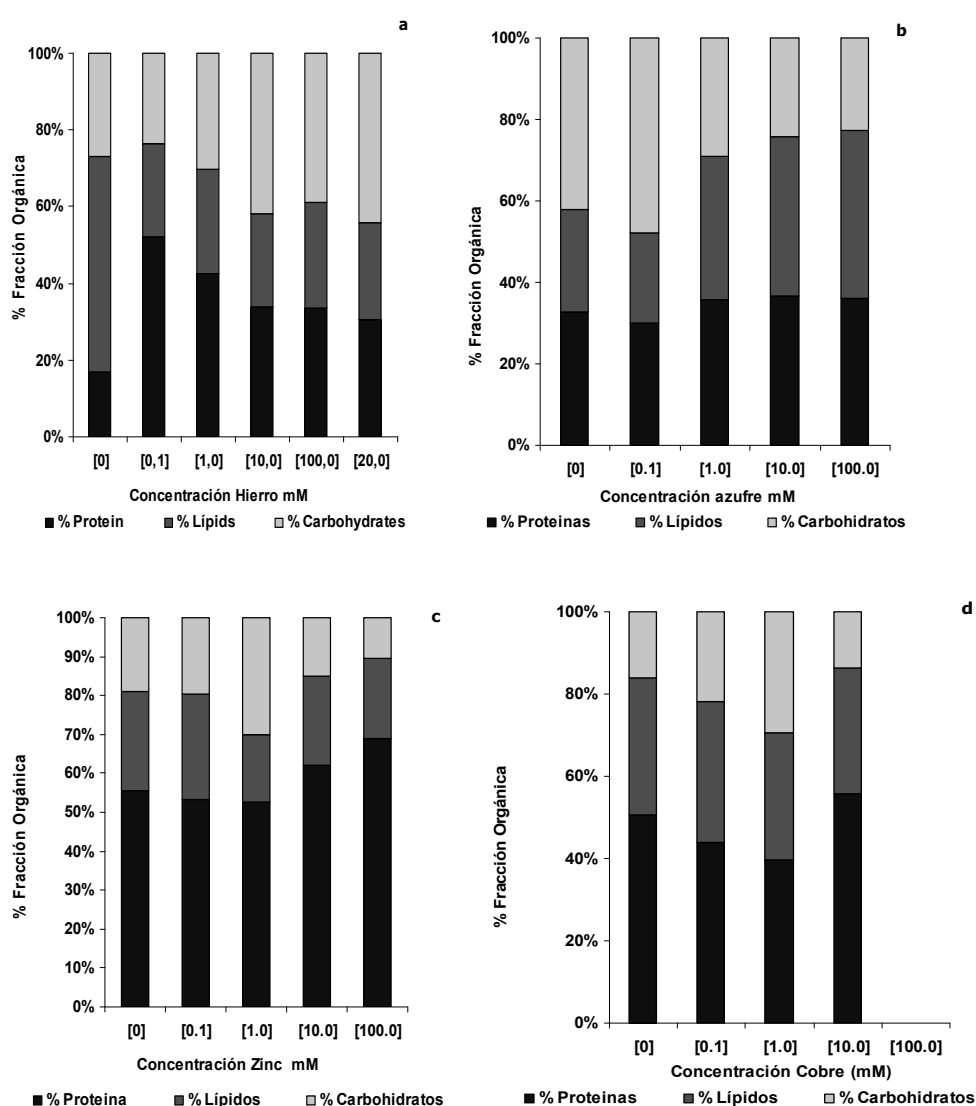


Figura 9.- Porcentajes de proteínas, lípidos y carbohidratos, respecto la concentración de elementos en *P. tricornutum* en cultivo semicontinuo: **(a)** Fe^{3+} , **(b)** S^{2-} , **(c)** Zn^{2+} , **(d)** Cu^{2+}

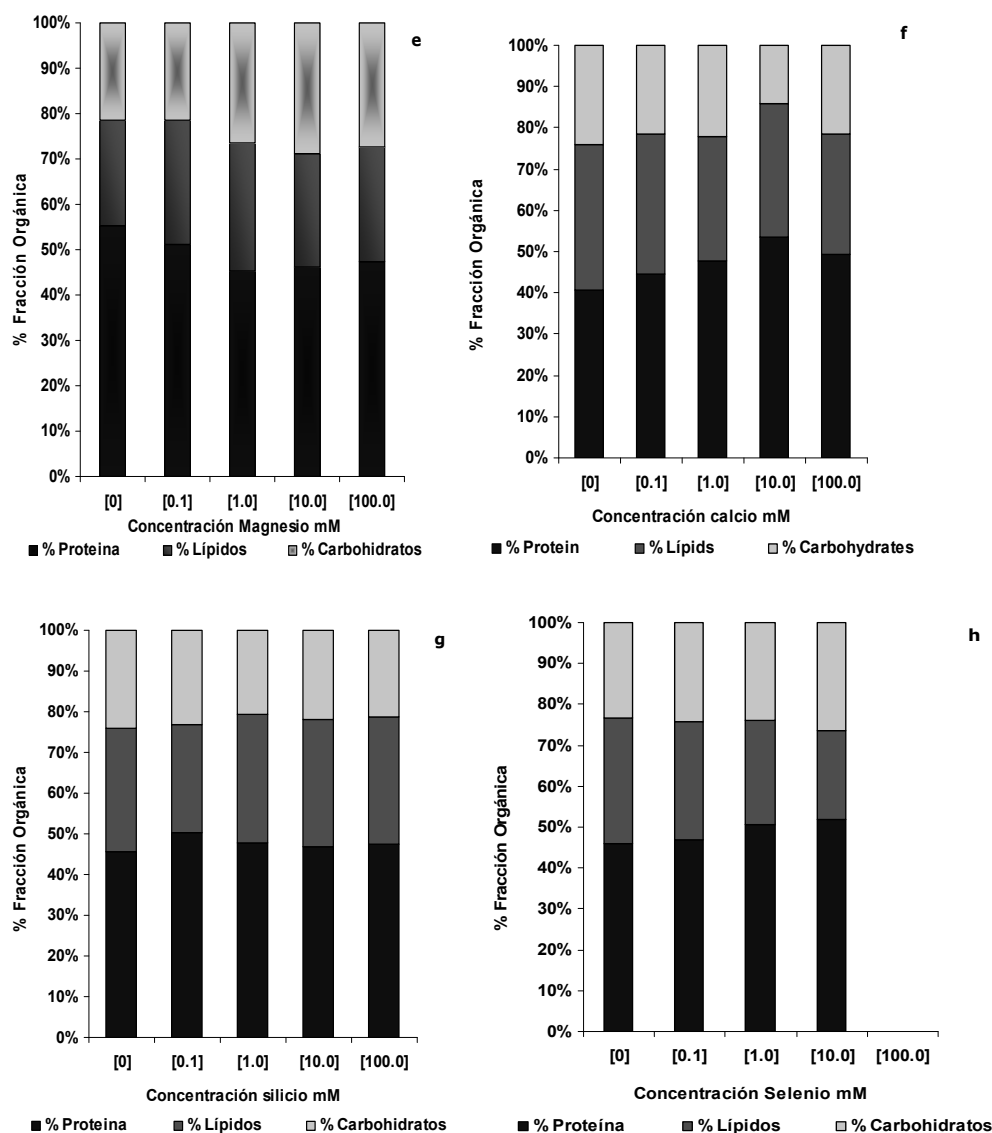


Figura 9.- Porcentajes de proteínas, lípidos y carbohidratos, respecto la concentración de elementos en *P. tricornutum* en cultivo semicontinuo: **(e)** Mg^{2+} , **(f)** Ca^{2+} **(g)** Si^{4+} , **(h)** Se^{2-} .

El peso seco celular máximo (pg.cel^{-1}) de cada elemento, correspondió con la evolución de el máximo de peso orgánico (proteínas+carbohidratos+lípidos pg.cel^{-1}); y por ende con el máximo de materia orgánica por célula (*tablas 3-10*) mostrando diferencias altamente significativas ($p=0,002$) entre las concentraciones experimentadas ($p<0,05$) y coeficientes de correlación r^2 polinomial positivos entre 0,80 y 0,99 (*tabla 11*). En lo referente al contenido celular de cenizas como se puede observar en la *figura 10 a-h* el valor de estas en todos los elementos, se incrementó conforme aumento la concentración del metal ($p<0,05$) (*tabla 3-10*), mostrando coeficientes de correlación r^2 polinomial positivos entre 0,80 y 0,99 (*tabla 11*). Contenidos de cenizas similares a este estudio fueron reportados por Markovits *et al.*,1991 y Rebollosa Fuentes *et al.*,2000 cercanos al 20,2 % del peso total celular en *Phaeodactylum tricornutum*.

Estudios realizados sobre la influencia en la concentración de nutrientes y la tasa de crecimiento sobre el contenido de cenizas contribuyen a poca información clarificadora sobre si un incremento del contenido celular en cenizas podría ser responsable de un descenso en Q_N en condiciones no limitantes (Otero, 1994). Sin embargo algunos autores (Fernández Reiríz *et al.*, 1989) en cultivos masivos han descrito un mayor contenido de cenizas en la fase exponencial de crecimiento que en fase estacionaria, otros más (Thomas *et al.*, 1984; Whyte 1987) no encuentran una tendencia definitiva de la presencia de cenizas con la concentración de nutrientes en cultivo discontinuo o en distintas fases de crecimiento en cultivos masivos.

En el presente estudio todos los elementos se acumularon de forma casi lineal respecto a la concentración de estos en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30% (tabla 3-10). Otero, 1994 menciona que aun cuando exista una reducción del contenido orgánico celular que en nuestro caso se observó después del óptimo elemental existe un incremento del contenido de cenizas.

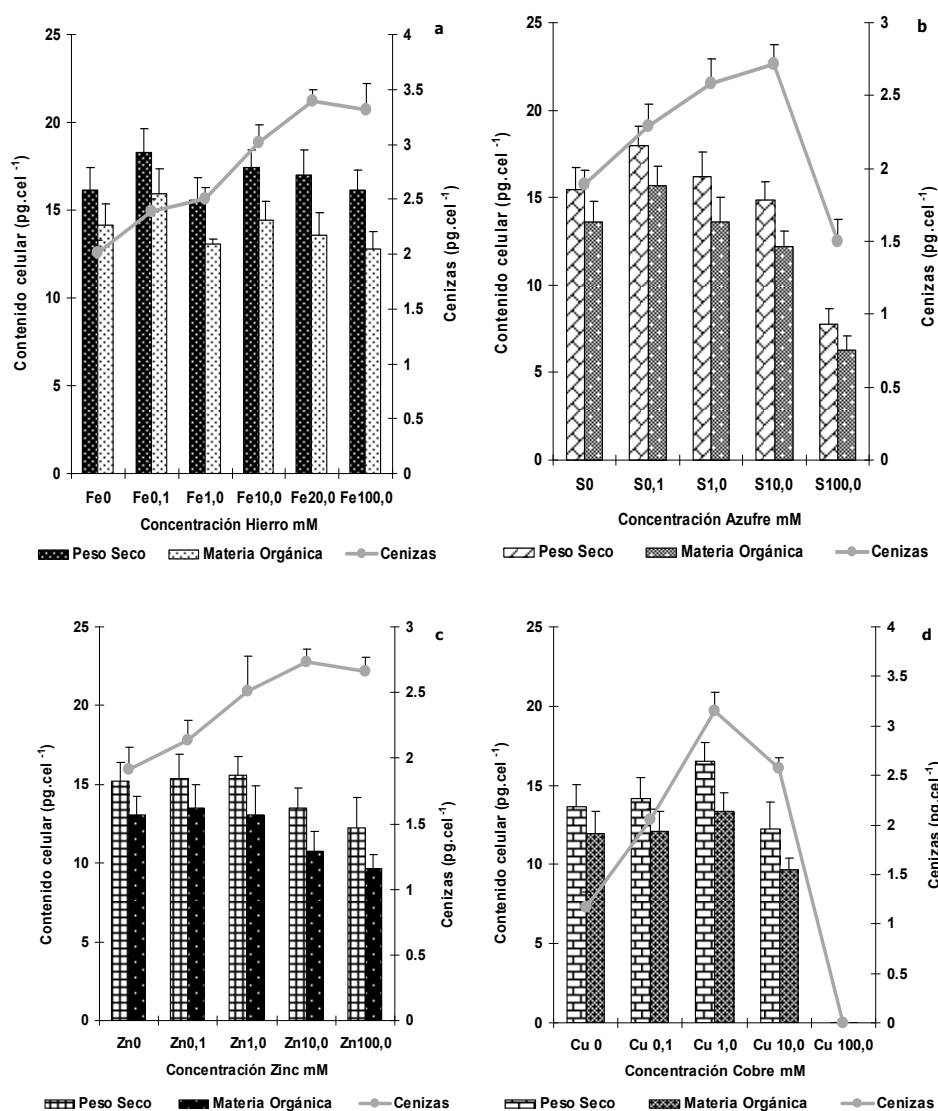


Figura 10.- Contenido celular: peso seco, materia orgánica y cenizas (pg.cel^{-1}) respecto la concentración de elementos en *P. tricornutum* en cultivo semicontinuo: **(a)** Fe^{3+} , **(b)** S^{2-} , **(c)** Zn^{2+} , **(d)** Cu^{2+} .

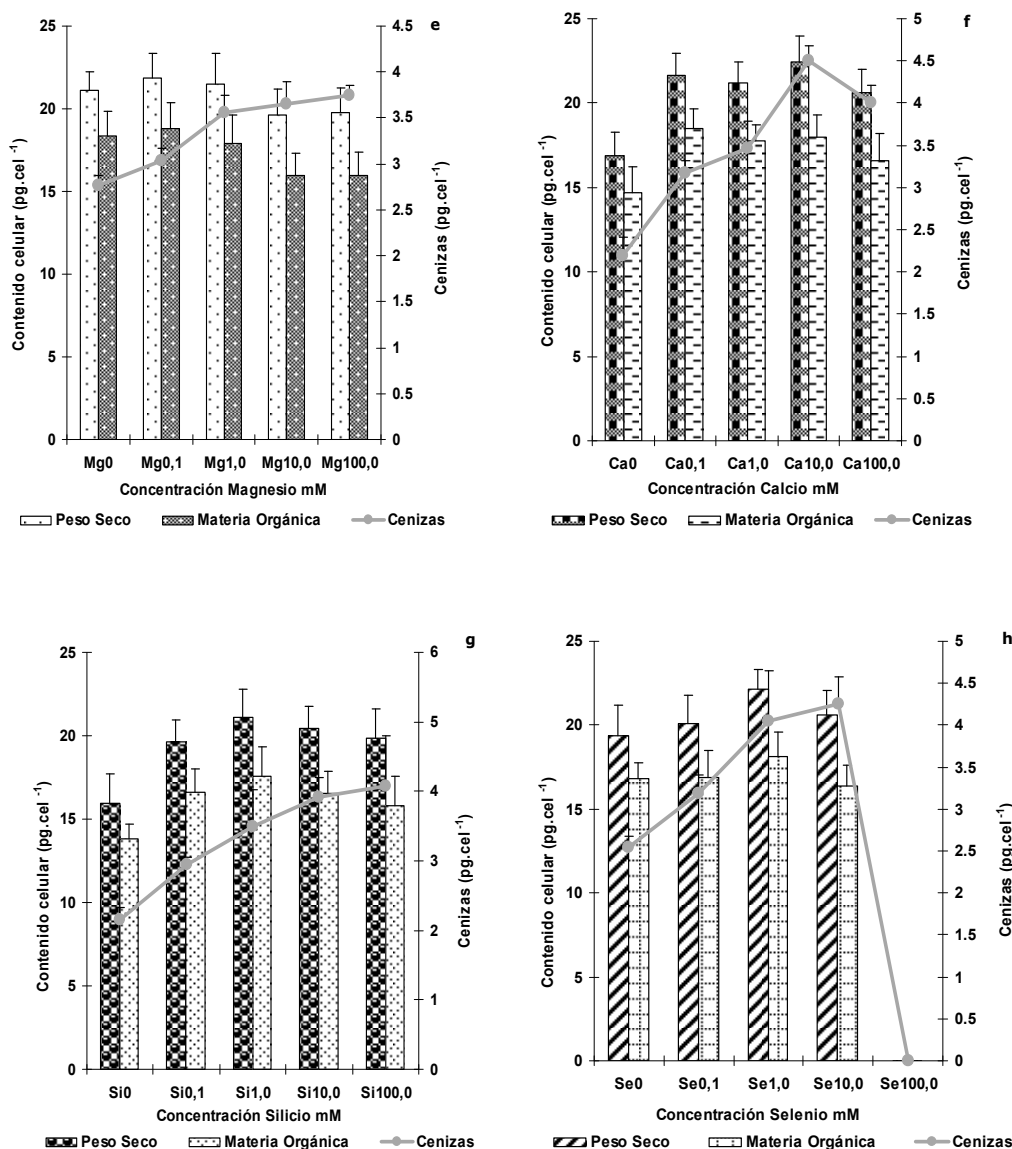


Figura 10.- Contenido celular: peso seco, materia orgánica y cenizas (pg.cel^{-1}) respecto la concentración de elementos en *P. tricornutum* en cultivo semicontinuo: **(e)** Mg^{2+} , **(f)** Ca^{2+} , **(g)** Si^{4+} , **(h)** Se^{2-} .

La incorporación en cultivo semicontinuo de S^{2-} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} y Se^{2-} en *Phaeodactylum tricornutum*, fue muy eficiente, conforme a la concentración, con coeficientes de correlación polinomial r^2 positivos de 0,92, 0,90, 0,95, 0,85, 0,99 respectivamente; en tanto que para el Fe^{3+} , Ca^{2+} y Si^{4+} la absorción fue lineal hasta la concentración 10 mM, para disminuir con la concentración 100 mM (figura 11 a-b) mostrando coeficientes de correlación polinomial r^2 positivos de 0,83, 0,77, 0,75 comparativamente, existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,002$) entre las condiciones experimentadas ($p<0,05$) (tabla 3-10). Dicha incorporación elemental concuerda con el comportamiento lineal del contenido celular de cenizas descrito en las tablas 3-10, al respecto Fábregas *et al.*, 1996a; Fábregas *et al.*, 1996b mencionan que *Phaeodactylum tricornutum* incrementa su volumen celular con la tasa de renovación lo que sugiere un mayor contenido de minerales. Un incremento en la concentración del elemento provoca un descenso del peso orgánico acompañado de

variaciones en el peso seco celular, el cual experimenta un óptimo para después decrecer hiperbólicamente. En condición de abundancia de nutrientes, las microalgas captan mayores cantidades de elementos del medio, es así que la presión osmótica celular aumenta, dando lugar a una mayor absorción de aniones y cationes. Darley, 1987, menciona que es debido tal fenómeno a que en los diferentes medios de cultivo la presencia del ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) ayuda ya sea a incrementar la disponibilidad de los elementos presentes o disminuir los niveles tóxicos de los iones libres.

La disminución del contenido orgánico celular en *Phaeodactylum tricornutum* fue compensado con un incremento del contenido del elemento conforme se aumento la concentración de este. Son diversos los mecanismos activos y pasivos para la incorporación de metales por las microalgas (Otero, 1994, Bhatnagar *et al.*, 2002). La pared celular de las microalgas tienen una gran capacidad para secuestrar o incorporar elementos (Wang *et al.*, 1998a). Este hecho es de una importancia especial, ya que las microalgas marinas constituyen el primer eslabón de la cadena trófica marina y por lo tanto, pueden transferir metales esenciales a niveles tróficos superiores (Folgar *et al.*, 2009); los cuales son de gran importancia ya que son responsables de una gran cantidad de procesos enzimáticos, antioxidantes y fisiológicos, que coadyuvan a mecanismos formadores de membrana, así como intervenir en procesos de metamorfosis en estadios larvales tempranos.

Ferreira, 2006 menciona que en tasas de renovación entre el 30% y 50% inicia la saturación por nutrientes, con lo cual la tasa de incorporación celular de elementos se hace mas eficiente, situación que así sucedió con todos los elementos en nuestros cultivos a una tasa de renovación del 30%.

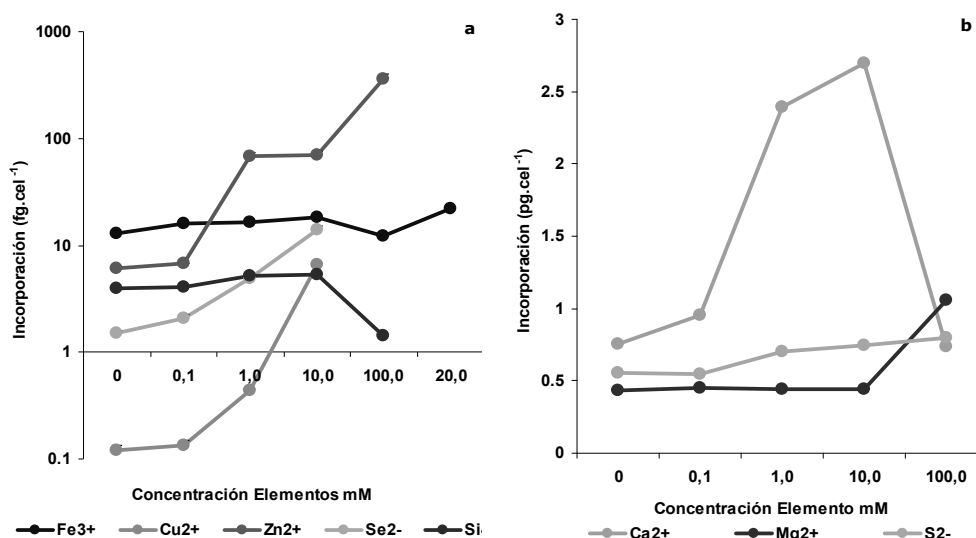


Figura 11.-Incorporación celular de elementos en *Phaeodactylum tricornutum*. en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ : **(a)** Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Se²⁻, Si⁴⁺, **(b)** Ca²⁺, Mg²⁺, S²⁻.

Los ácidos grasos (AG) más abundantes en *Phaeodactylum tricornutum* están representados por el 14:0, 16:0, 16:1(n-7) (Reitan *et al.*,1994; Zhukova *et al.*,1998); los cuales se estimaron entre el 5 y 48% del total de los AG y que concuerdan con los descritos por Rivero-Rodríguez *et al.*,2007. Diversos autores como Heiba *et al.*,1997; Colombo *et al.*,2006; Vanitha *et al.*,2007 e Imbs *et al.*,2007 describen que tal diatomea posee una composición del 45% de AG saturados especialmente el ácido mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0), seguida de un 39% de AG monoinsaturados donde destacan el ácido palmitoleico (C16:1n-7), ácido elaídico (C18:1n-9), y un 10% de AG poliinsaturados especialmente el ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (C20:5n-3); porcentajes que concuerdan con nuestros resultados independientemente del elemento experimentado.

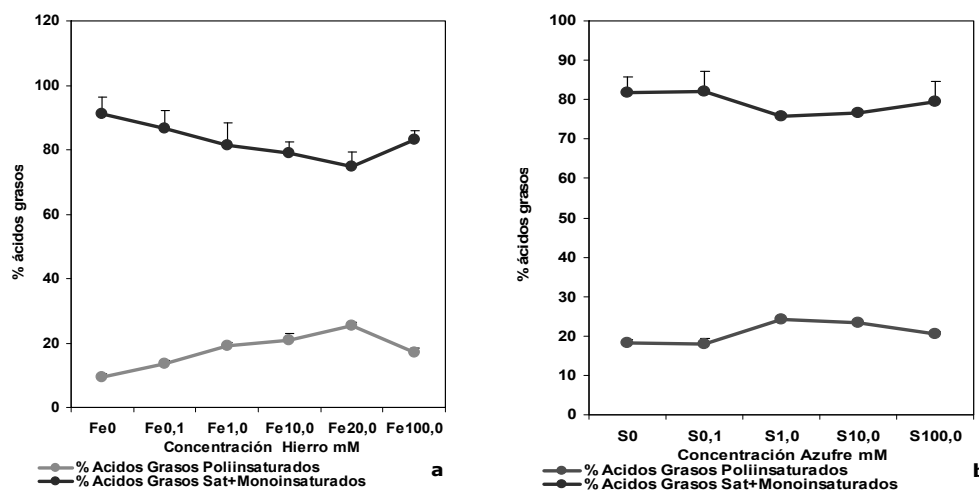
Cada elemento con base en las diferentes concentraciones ensayadas, mostraron diversos grados de evolución respecto a incrementar o decrecer porcentualmente tales AG. Siendo un hecho que en base a la concentración del ácido palmítico (16:0) y palmitoleico (16:1(n-7)) fue posible la elongación y desaturación vía enzimática (Zhukova *et al.*,1998; Huang *et al.*,2010) a otros ácidos grasos de cadena más larga, importantes y de concentración apreciable en esta diatomea, como lo fueron el 16:3(n-3), 18:0, 18:1(n-9), 18:1(n-7), 18:2(n-6), y 18:3(n-6) que originan series de otros AG insaturados de cadena aun más larga como el 20:5(n-3) (tabla 12-19). Destacando el ácido graso eicosapentaenoico (Dunstan *et al.*,1994; Ying *et al.*,2000) como precursor de eicosanoides (Dyeberg, 1986), el cual incremento su presencia celular en la medida en que se llegó a un óptimo en base a la concentración del elemento, en el medio de cultivo; con coeficientes de correlación r^2 entre 0,60 y 0,98 (tabla 11), y que es reflejo de la evolución de los lípidos celulares. Ese óptimo de concentración correspondió con el máximo contenido de ácidos grasos totales (AGT) por célula con una tasa de renovación del 30% (tabla 12-19); existiendo en ambos casos diferencias altamente significativas ($p=0,002$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$).

El máximo contenido de AGT pg.cel^{-1} que correspondió, del contenido lipídico celular en *Phaeodactylum tricornutum* por elemento fue el siguiente: Fe^{3+} (88,9%), S^{2-} (63,82%), Zn^{2+} (98,30), Cu^{2+} (56,6%), Mg^{2+} (53,08%), Ca^{2+} (71,29%), Si^{4+} (34,95%), Se^{2-} (77,75%).

Se observaron importantes diferencias en la evolución porcentual y pg.cel^{-1} de los ácidos grasos saturados (AGS) y los monoinsaturados (AGM) con respecto a los poliinsaturados (AGP), existiendo en todos casos diferencias altamente significativas ($p=0,002$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$). con r^2 que se expresan en la tabla 11; donde el decremento de los AGS más AGM correspondió con el incremento de los AGP (figura 12 a-h y tablas 12-19); que además coincidió con la concentración óptima de los elementos Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , y Se^{2-} para la máxima generación porcentual del ácido graso poliinsaturado ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3, EPA) con valores de 10,58, 10,46, 10,12, 11,87, 15,08, 7,50, 9,33, y 7,61% respectivamente (tabla 12-19) existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,002$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$). Tal ácido graso es esencial para el crecimiento y reproducción de organismos acuáticos (Zhukova *et al.*,1998).

Dichos valores se encuentran por debajo de lo reportado por Dunstan *et al.*, 1994 y Atalah *et al.*, 2007 para *Phaeodactylum tricornutum*, sin embargo Ying *et al.*, 2000 menciona un rango de entre 6,5 y 19,5 % rango dentro de el cual caen nuestros resultados (tabla 12-19); mencionando que la existencia de diversas cepas o líneas de la especie y diversidad de sitios de donde han sido aisladas, así como la constitución del medio de cultivo trae consigo una gran variabilidad de sus lípidos totales así mismo los AG totales. El incremento en la concentración del elemento vía la máxima generación de lípidos que coincide con Q_C (tabla 3-10), que es la base o fuente de producción o generación de los lípidos (Huang *et al.*, 2010); desplaza la formación de lípidos neutros o triglicéridos los cuales poseen ácidos grasos de baja insaturación por fosfolípidos o galactolípidos (lípidos polares) en la forma de sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) y fosfatidilglicerol (PG) (Goss *et al.*, 2009) y que en *Phaeodactylum tricornutum* y en la mayoría de las diatomeas representan el 40% de los AG poliinsaturados de las series ω -3 y ω -6 (Arao *et al.*, 1987, Mata *et al.*, 2010).

El ácido palmítico (16:0) y palmitoleico (16:1(n-7) con respecto a la concentración de la mayoría de los elementos estudiados, mostró la tendencia a decrecer o mantener su concentración en beneficio de incrementar los AG poliinsaturados (polares), principalmente el AGP 20:5n-3, EPA, como se observa en las tablas 12-19. Tal discusión es corroborada con lo concluido por Ying *et al.*, 2000 y Pratoomyot *et al.*, 2005, mencionando que el ácido palmítico (16:0) puede variar su presencia celular entre el 13,5% y 26,4% en tanto que el palmitoleico (16:1(n-7) puede estar presente entre el 21,1% y 46,3% valores que concuerdan con los resultados del presente estudio. Parrish and Wangersky 1987, mencionan que existen diferencias en la tasa de producción de las distintas clases de lípidos, tanto en la cantidad como en los lípidos producidos bajo condiciones de deficiencia o suficiencia de nutrientes. Al respecto Parrish and Wangersky 1987 y Siron *et al.*, 1989 mencionan que la síntesis intracelular de triglicéridos en *Phaeodactylum tricornutum* se incrementa bajo condiciones de estrés por nitrógeno o condiciones de limitación por fósforo con el incremento de el ácido palmítico (16:0) y palmitoleico (16:1(n-7) y decremento de lípidos polares específicamente EPA; asociados a membranas.



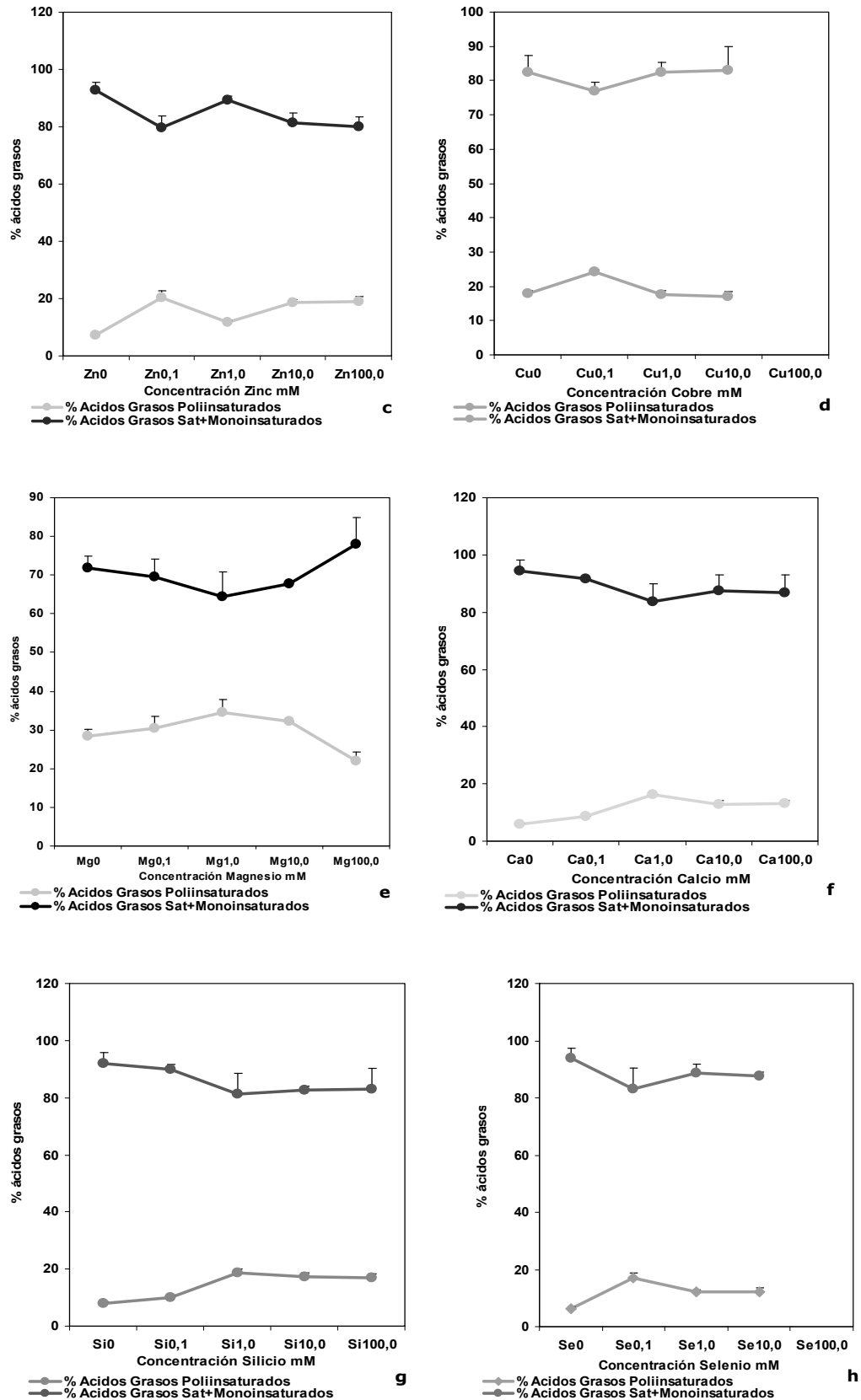


Figura 12.- Evolución porcentual del contenido de ácidos grasos con respecto a la concentración del elemento en *P. tricornutum* en cultivo semicontinuo: **(a)** Fe^{3+} , **(b)** S^{2-} , **(c)** Zn^{2+} , **(d)** Cu^{2+} , **(e)** Mg^{2+} , **(f)** Ca^{2+} , **(g)** Si^{4+} , **(h)** Se^{2-} .

Dentro del grupo de los ácidos grasos poliinsaturados se encuentran tres grandes familias, mediante las cuales se derivan los procesos de elongación a ácidos grasos de cadena larga como son la **serie ω -3, ω -6 y ω -9**; de los cuales las series importantes son la ω -3 y ω -6, así mismo la proporción entre estas dos series es de relevante importancia en el valor energético celular en los siguientes niveles tróficos, por lo que una mayor proporción de los ω -3 es imprescindible en mecanismos formadores de membrana en etapas tempranas de desarrollo larval de organismos marinos. Es así que las proporciones de ácidos grasos **ω -3: ω -6** por célula tendieron a incrementarse con la concentración de cada elemento ensayado y ser diferentes de la concentración 0 (*tabla 12-19*), donde no existe el elemento en el medio de cultivo por lo tanto se hallaron diferencias altamente significativas ($p=0,002$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$), con índices de correlación entre 0,63 y 0,86 (*tabla 11*). La proporción porcentual de los AG **ω -3: ω -6** en los elementos estudiados se encontró entre 2,98 y 8,10 (*tabla 12-19*) valores por debajo de los reportados por Rivero-Rodríguez *et al.*, 2007 (10,4%).

Un aspecto importante desde el punto de vista nutricional en niveles superiores de la trama trófica alimenticia; es la proporción que existe del total de los ácidos grasos, el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3 EPA) y el ácido araquidónico (20:4n-6 ARA), tal proporción EPA:ARA es muy importante en la alimentación de las primeras etapas de desarrollo larval.

En los peces planos, la metamorfosis y el desarrollo de la pigmentación son controlados a nivel nervioso y neuroendocrinológico. En consecuencia, la producción anormal de eicosanoides en el cerebro como resultado de la alteración de los niveles de ARA y EPA trae consigo graves consecuencias para el desarrollo y la metamorfosis de las larvas de peces planos, incluyendo su anormal pigmentación; por lo que la proporción de EPA que promueve la formación de membranas a nivel celular sobre la proporción de ARA deberá ser siempre superior (Estévez *et al.*, 1999).

En el presente estudio motivo de la inclusión de diferentes concentraciones de Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} en *Phaeodactylum tricornutum* logramos incrementar tales proporciones en el rango de 5,2% al 15,47% como se puede observar en las *tablas 12-19* existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,002$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$) con coeficientes de correlación r^2 en el rango de 0,67 a 0,95 (*tabla 11*).

En lo que respecta al ácido docosaexaenoico (22:6n-3 DHA) la concentración porcentual de este con respecto al total de ácidos grasos fue muy pobre, detectándose su presencia solo en las concentraciones óptimas de los elementos estudiados como se puede observar en las *tabla 12-19*. Otero, 1994, menciona que en esta diatomea el contenido máximo de DHA se obtiene con tasas de renovación bajas como por ejemplo del 10%.

El uso de microalgas específicas como fuentes de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), ya sea para su incorporación en la acuicultura o la dieta humana, recibe un creciente interés. El perfil de ácidos grasos intracelular en una especie determinada es posible dentro de ciertos límites manipularlo, ya sea sobre su metabolismo, modulando los parámetros de crecimiento microalgal; o la correlación entre los componentes del medio de cultivo (Carvalho *et al.*, 2006). La nutrición mineral y los efectos de la variación en la composición del medio de cultivo en la producción de ácidos grasos es posible mediante la inclusión en el medio de cultivo de ciertos elementos que además de cumplir con funciones fisiológicas celulares, coadyuvan en la calidad bioquímica de la misma. Comportamientos similares en la cantidad de los ácidos grasos han sido manifestados por Feng *et al.*, 2005; los cuales concluyen que la adición en el medio de cultivo de moléculas orgánicas e inorgánicas mejora la producción de lípidos y ácidos grasos poliinsaturados en microalgas.

Reboloso Fuentes *et al.*, 2000 mencionan que los minerales si son biodisponibles y no tóxicos en la microalgas estas podrían ser utilizadas con fines alimenticios, debido a la cantidad y la diversidad de nutrientes que contienen. Además, de que la composición de la biomasa puede ser modificada por medio de variables operacionales, principalmente mediante el uso de los tiempos de residencia corta para obtener mayores concentraciones de AG poliinsaturados como el EPA, además de un mayor enriquecimiento por proteína.

Tabla 3
Cultivo en semicontinuo de *Phaeodactylum tricornutum* + HIERRO
Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L
Tasa de renovación 30%.día⁻¹

	0 mM	0.1 mM	1.0 mM	10.0mM	100.0mM	20.0mM
Densidad celular (10⁶ cél.mL⁻¹ ±std)	1,971 ±0,088	7,425 ±0,672	39,861 ±3,340	45,383 ±1,898	44,926 ±3,344	48,504 ±3,426
Productividad (10⁹céls.L⁻¹.día⁻¹)	0,591	2,227	11,958	13,615	13,478	14,551
% proteína en F.O.	16,786	52,006	42,671	34,030	33,653	30,722
% carboh. en F.O.	26,882	23,585	30,205	41,711	39,027	44,173
% lípidos en F.O.	56,331	24,409	27,124	24,259	27,320	25,105
Proteína (pg.cél⁻¹ ± std)	2,371a ±0,103	8,281d ±0,330	5,581cd ±0,226	4,899bcd ±0,024	4,304abc ±0,048	4,176ab ±0,017
Carbohidratos (pg.cél⁻¹ ± std)	3,796a ±0,101	3,755ab ±0,060	3,950bc ±0,072	6,006c ±0,235	4,992bc ±0,029	6,004c ±0,108
Lípidos (pg.cél⁻¹ ± std)	7,955c ±0,184	3,887b ±0,068	3,547ab ±0,088	3,493a ±0,003	3,494ab ±0,072	3,412ab ±0,166
Peso orgánico pg.cel⁻¹	14,122	15,923	13,078	14,398	12,79	13,592
Valor calórico (10⁻⁷ J.cél⁻¹)	4,370	4,161	3,412	3,575	3,262	3,369
Peso seco µg.mL⁻¹ ±std	18,5 ±0,65	70,76 ±2,24	616,73 ±11,19	861,76 ±1,10	1099,73 ±7,86	956,0 ±20,35
Peso seco (pg.cel⁻¹ ±std)	16,13b ±1,33	18,32e ±1,30	15,57a ±1,28	17,42d ±1,02	16,11b ±1,17	16,99c ±1,42
Cenizas pg.cel⁻¹ ±std	2,01a ±0,117	2,39b ±0,099	2,50c ±0,103	3,02d ±0,155	3,32e ±0,108	3,39e ±0,232
Materia Orgánica pg.cel⁻¹ ±std	14.122c ±1,23	15.92e ±1,40	13,08a ±1,27	14,40d ±1,13	12,79a ±0,99	13,59b ±1,29
Nitrógeno Residual mM ± std	2,43 ±0.020	2,29 ±0,019	0 ±	0 ±	0 ±	0 ±
Tasa Máxima Crecimiento (div.día⁻¹)	2,11	2,25	2,35	2,33	2,19	2,34
Q_N celular (pg)	0,393a ±0.025	0,624b ±0.048	1,120c ±0.146	1,217c ±0.125	1,210c ±0.157	1,277c ±0.107
Q_C celular (pg)	6,421a ±0.162	6,558ab ±0.404	7,670b ±0.451	9,108c ±0.228	9,567c ±0.270	9,769c ±0.204
RelaciónC:N(átomos)	16,33b	10,51ab	6,85a	7,48ab	7,91ab	7,65ab
Absorción Atómica Fe (fg.cél⁻¹ ± std)	13,0a ±1,03	16,0ab ±1,12	16,5abc ±1,16	18,0bcd ±1,15	12,0d ±1,14	22,0c ±1,13

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 4
Cultivo en semicontinuo de *Phaeodactylum tricornutum* + AZUFRE
Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L
Tasa de renovación 30%.día⁻¹

	0 mM	0.1 mM	1.0 mM	10.0 mM	100.0 mM
Densidad celular (10⁶ céls.mL⁻¹±std)	43,293 ±2,281	43,944 ±1,417	30,576 ±3,280	21,992 ±2,625	19,68 ±1,548
Productividad (10⁹ céls.L⁻¹.día⁻¹)	12,988	13,183	9,173	6,597	5,904
% proteína en F.O.	32,801	30,089	35,631	36,666	35,915
% carboh. en F.O.	41,984	47,833	29,016	24,229	22,844
% lípidos en F.O.	25,216	22,078	35,353	39,105	41,241
Proteína (pg.cél⁻¹ ± std)	4,455b ±0,403	4,714b ±0,023	4,851b ±0,043	4,461b ±0,146	2,255a ±0,056
Carbohidratos (pg.cél⁻¹ ± std)	5,702d ±0,104	7,494e ±0,228	3,950b ±0,042	2,948c ±0,062	1,434a ±0,068
Lípidos (pg.cél⁻¹ ± std)	3,425a ±0,057	3,459a ±0,028	4,813b ±0,046	4,758b ±0,097	2,590a ±0,257
Peso orgánico pg.cél⁻¹	13,582	15,667	13,614	12,167	6,279
Valor calórico (10⁻⁷ J.cél⁻¹)	3,390	3,767	3,741	3,457	1,811
Peso seco.µg.mL⁻¹ ±std	401.73 ±10,30	422,03 ±4,92	491,26 ±11,76	448,17 ±22,15	473,63 ±17,72
Peso seco (pg.cel⁻¹) ±std	15,47c ±1,24	17,96e ±1,11	16,20d ±1,38	14,89b ±1,01	7,78a ±0,90
Cenizas pg.cel⁻¹ ±std	1,89b ±0,009	2,29c ±1,05	2,58d ±0,170	2,72e ±0,126	1,50a ±0,148
Materia Orgánica pg.cel⁻¹ ±std	13,58c ±1,23	15,67d ±1,11	13,61c ±1,43	12,17b ±0,89	6,28a ±0,86
Nitrógeno Residual mM ± std	0 ±	0 ±	1,40 ±0,015	2,01 ±0,017	2,1 ±0,018
Tasa Máxima Crecimiento (div.día⁻¹)	2,38	2,45	2,25	1,88	0,55
Q_N celular (pg)	0,937b ±0,044	1,024c ±0,120	0,940b ±0,07	0,924b ±0,028	0,823a ±0,026
Q_C celular (pg)	7,180ab ±0,182	7,596b ±0,270	7,346ab ±0,277	7,050ab ±0,82	7,000a ±0,162
RelaciónC:N(átomos)	7,66ab	7,42a	7,81ab	7,63ab	8,50b
Absorción Atómica S (pg.cél⁻¹ ± std)	0,54a ±0,045	0,55a ±0,035	0,70b ±0,061	0,75c ±0,052	0,79c ±0,038

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

Tabla 5
Cultivo en semicontinuo de *Phaeodactylum tricornutum* + ZINC
Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L
Tasa de renovación 30%.día⁻¹

	0 mM	0.1 mM	1.0 mM	10.0 mM	100.0 mM
Densidad celular (10⁶ céls.mL⁻¹ std)	37,535 ±3,035	43,000 ±2,270	27,179 ±1,161	16,660 ±1,514	16,283 ±1,527
Productividad (10⁹ céls.L⁻¹.día⁻¹)	11,260	12,900	8,154	4,998	4,885
% proteína en F.O.	55,535	53,333	52,584	62,131	68,812
% carboh. en F.O.	19,114	19,686	30,164	15,118	10,469
% lípidos en F.O.	25,351	26,981	17,251	22,751	20,720
Proteína (pg.cél⁻¹ ± std)	7,483c ±0,111	6,971ab ±0,035	6,886a ±0,110	6,678c ±0,036	6,612bc ±0,072
Carbohidratos (pg.cél⁻¹ ± std)	2,576bc ±0,137	2,573bc ±0,013	3,950c ±0,006	1,625ab ±0,028	1,006a ±0,039
Lípidos (pg.cél⁻¹ ± std)	3,416bc ±0,204	3,526c ±0,124	2,259a ±0,033	2,445ab ±0,283	1,991a ±0,089
Peso orgánico pg.cel⁻¹	13,475	13,070	13,095	10,748	9,609
Valor calórico (10⁻⁷ J.cél⁻¹)	3,584	3,505	3,213	2,845	2,544
Peso seco µg.mL⁻¹ ±std	353,53 ±5,75	578,46 ±22,07	477,63 ±3,75	305,70 ±4,21	389,13 ±14,18
Peso seco (pg.cel⁻¹) ±std	15,39c ±1,15	15,21c ±1,51	15,60d ±1,14	13,48b ±1,25	12,27a ±1,087
Cenizas pg.cel⁻¹ ±std	1,91a ±0,174	2,14b ±0,15	2,51c ±0,270	2,73e ±0,104	2,66d ±0,113
Materia Orgánica pg.cel⁻¹ ±std	13,47c ±1,20	13,07c ±1,52	13,09d ±1,80	10,75b ±1,26	9,61a ±0,91
Nitrógeno Residual mM ± std	0,06 ±0,0005	0,12 ±0,015	1,76 ±0,10	1,43 ±0,12	1,91 ±0,20
Tasa Máxima Crecimiento (div.día⁻¹)	1,54	1,49	1,25	1,58	1,37
Q_N celular (pg)	1,087b ±0,14	1,219c ±0,130	1,083b ±0,103	0,973a ±0,041	0,961a ±0,062
Q_C celular (pg)	7,799ab ±0,151	8,018b ±0,161	7,803ab ±0,94	7,598ab ±0,52	7,319a ±0,395
RelaciónC:N(átomos)	7,17ab	6,58a	7,20ab	7,81b	7,62ab
Absorción Atómica Zn (fg.cél⁻¹ ± std)	6,1a ±0,35	6,7a ±0,18	68,0b ±4,63	69,1b ±4,96	360,0c ±10,04

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 6
Cultivo en semicontinuo de *Phaeodactylum tricornutum* + COBRE
Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L
Tasa de renovación 30%.día⁻¹

	0 mM	0.1 mM	1.0 mM	10.0 mM	100.0 mM
Densidad celular (10 ⁶ céls.mL ⁻¹ std)	44,071 ±0,865	52,308 ±3,309	48,942 ±2,953	48,154 ±1,270	----
Productividad (10 ⁹ céls.L ⁻¹ .día ⁻¹)	13,221	15,6925	14,682	14,446	----
% proteína en F.O.	50,514	43,840	39,651	55,618	----
% carboh. en F.O.	16,060	21,762	29,517	13,630	----
% lípidos en F.O.	33,426	34,398	30,832	30,752	----
Proteína (pg.cél ⁻¹ ± std)	6,035c ±0,166	5,319ab ±0,099	5,306ab ±0,058	5,364ab ±0,034	----
Carbohidratos (pg.cél ⁻¹ ± std)	1,919ab ±0,093	2,640bc ±0,026	3,950c ±0,274	1,314a ±0,027	----
Lípidos (pg.cél ⁻¹ ± std)	3,994b ±0,061	4,174b ±0,134	4,126b ±0,161	2,966a ±0,171	----
Peso orgánico pg.cel⁻¹	11,948	12,133	13,382	9,644	----
Valor calórico (10 ⁻⁷ J.cél ⁻¹)	3,356	3,378	3,577	2,68	----
Peso seco µg.mL⁻¹ ±std	414,0 ±17,0	685,5 ±14,4	945,36 ±7,57	1272,36 ±35,18	----
Peso seco (pg.cel⁻¹ ±std)	13,66b ±1,39	14,19c ±1,28	16,53d ±1,15	12,21a ±1,73	----
Cenizas (pg.cel⁻¹ ±std)	1,71a ±0,150	2,05b ±0,104	3,15c ±0,187	2,57d ±0,110	----
Materia Orgánica (pg.cel⁻¹ ±std)	11,95b ±1,43	12,133c ±1,25	13,38d ±1,15	9,64a ±0,77	----
Nitrógeno Residual mM ± std	0 ±	0 ±	0 ±	0 ±	----
Tasa Máxima Crecimiento (div.día ⁻¹)	1,11	1,56	1,99	2,29	----
Q_N celular (pg)	1,079a ±0,122	1,355b ±0,125	1,138a ±0,136	1,093a ±0,109	----
Q_C celular (pg)	8,093a ±0,212	8,736b ±0,343	8,359ab ±0,77	7,862a ±0,267	----
RelaciónC:N(átomos)	7,50b	6,45a	7,34a	7,19a	----
Absorción Atómica Cu (fg.cél ⁻¹ ± std)	0,12a ±0,001	0,13b ±0,01	0,45c ±0,01	6,6d ±0,32	----

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 7
Cultivo en semicontinuo de *Phaeodactylum tricornutum* + MAGNESIO
Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L
Tasa de renovación 30%.día⁻¹

	0 mM	0.1 mM	1.0 mM	10.0 mM	100.0 mM
Densidad celular (10 ⁶ céls.mL ⁻¹ std)	18.20 ±0.56	20.03 ±0.37	20.97 ±1.33	24.27 ±0.47	20.39 ±0.61
Productividad (10 ⁹ céls.L ⁻¹ .día ⁻¹)	5.46	6.01	6.29	7.28	6.12
% proteína en F.O.	55.34	51.23	45.44	46.07	47.24
% carboh. en F.O.	21.58	21.61	26.44	28.83	27.45
% lípidos en F.O.	23.08	27.16	28.13	25.10	25.32
Proteína (pg.cél ⁻¹ ± std)	10.17b ±0.14	9.63b ±0.090	8.14a ±0.097	7.35a ±0.15	7.56ab ±0.089
Carbohidratos (pg.cél ⁻¹ ± std)	3.97ab ±0.037	4.06a ±0.099	4.74ab ±0.11	4.60b ±0.12	4.39ab ±0.077
Lípidos (pg.cél ⁻¹ ± std)	4.24ab ±0.75	5.10c ±0.12	5.03bc ±0.27	4.01a ±0.10	4.05a ±0.13
Peso orgánico (pg.cel ⁻¹)	18,38	18,79	17,91	15,96	16,0
Valor calórico (10 ⁻⁷ J.cél ⁻¹)	4.79	5.02	4.75	4.13	4.16
Peso seco (µg.mL ⁻¹ ±std)	364,4 ±7,55	502,33 ±7,65	591,63 ±30,67	561,00 ±10,64	635,38 ±8,45
Peso seco (pg.cel ⁻¹ ±std)	21,15b ±1,41	21,83d ±1,35	21,47c ±1,25	19,62a ±1,52	19,75a ±1,37
Cenizas (pg.cel ⁻¹ ±std)	2,77a ±0,107	3,04b ±0,125	3,56c ±0,182	3,66d ±0,231	3,75d ±0,109
Materia Orgánica (pg.cel ⁻¹ ±std)	18,38c ±1,47	18,79d ±1,57	17,91b ±1,74	15,96a ±1,35	16,00a ±1,42
Tasa Máxima Crecimiento (div.día ⁻¹)	2,44	2,31	2,41	2,37	2,13
Nitrógeno Residual (mM ± std)	2.57 ±0.11	2.26 ±0.21	2.59 ±0.39	2.48 ±0.23	2.53 ±0.31
Q _N celular (pg)	0,764a ±0.059	0,869bc ±0.036	0,973d ±0.013	0,902cd ±0.08	0,856abc ±0.032
Q _C celular (pg)	6,377a ±0.836	6,915bc ±0.424	7,443d ±0.153	6,937cd ±0.68	6,810abc ±0.118
RelaciónC:N(átomos)	8,34b	7,96ab	7,65a	7,69ab	7,95ab
Absorción Atómica Mg (pg.cél ⁻¹ ±std)	0,43a ±0,06	0,45ab ±0,021	0,44a ±0,04	0,44a ±0,021	1,06b ±0,08

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 8
Cultivo en semicontinuo de *Phaeodactylum tricornutum* + CALCIO
Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L
Tasa de renovación 30%.día⁻¹

	0 mM	0.1 mM	1.0 mM	10.0 mM	100.0 mM
Densidad celular (10 ⁶ céls.mL ⁻¹ std)	18,462 ±0,964	21,967 ±0,773	24,642 ±0,235	20,521 ±0,982	21,879 ±2,027
Productividad (10 ⁹ céls.L ⁻¹ .día ⁻¹)	5,54	6,59	7,39	6,16	6,56
% proteína en F.O.	40,613	44,665	47,758	53,561	49,218
% carboh. en F.O.	23,975	21,571	22,247	14,045	21,611
% lípidos en F.O.	35,412	33,764	29,996	32,394	29,171
Proteína (pg.cél ⁻¹ ± std)	5,959a ±0,114	8,251c ±0,187	8,480bcd ±0,019	8,885d ±0,258	8,837d ±0,047
Carbohidratos (pg.cél ⁻¹ ± std)	3,518ab ±0,158	3,984b ±0,110	3,950a ±0,099	2,330ab ±0,044	3,880ab ±0,029
Lípidos (pg.cél ⁻¹ ± std)	5,197a ±0,174	6,237b ±0,054	5,326a ±0,022	5,374ab ±0,102	5,238a ±0,042
Peso orgánico pg.cel⁻¹	14,674	18,472	17,756	16,589	17,955
Valor calórico (10 ⁻⁷ J.cél ⁻¹)	4,086	5,127	4,814	4,656	4,852
Peso seco (µg.mL⁻¹ ±std)	364,4 ±7,55	502,33 ±7,65	591,67 ±30,67	561,50 ±10,64	635,38 ±8,45
Peso seco (pg.cel⁻¹ ±std)	16,87a ±1,41	21,64c ±1,35	21,23c ±1,25	20,60b ±1,52	22,46d ±1,37
Cenizas (pg.cel⁻¹ ±std)	2,19a ±0,22	3,17b ±0,142	3,47c ±0,322	4,01d ±0,16	4,51e ±0,20
Materia Orgánica (pg.cel⁻¹ ±std)	16,87a ±1,56	18,47c ±1,21	17,76b ±0,93	16,60a ±1,38	17,955b ±1,58
Tasa Máxima Crecimiento (div.día ⁻¹)	1,98	2,32	2,50	2,31	2,15
Nitrógeno en el medio mM ± std	2,74 ±0,29	2,84 ±0,20	2,17 ±0,29	3,06 ±0,35	3,32 ±0,25
Q_N celular (pg)	0,840a ±0,049	0,900ab ±0,052	0,958b ±0,011	0,879ab ±0,041	0,869ab ±0,012
Q_C celular (pg)	6,377a ±0,836	6,857ab ±0,498	7,327b ±0,188	6,814ab ±0,143	6,584 ±0,206
RelaciónC:N(átomos)	7,59ab	7,62ab	7,65ab	7,75b	7,58a
Absorción Atómica Ca(pg.cél⁻¹ ±std)	0,76a ±0,054	0,95b ±0,132	2,39c ±0,290	2,69c ±0,351	0,73a ±0,028

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 9
Cultivo en semicontinuo de *Phaeodactylum tricornutum* + SILICIO
Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L
Tasa de renovación 30%.día⁻¹

	0 mM	0.1 mM	1.0 mM	10.0 mM	100.0 mM
Densidad celular (10⁶ céls.mL⁻¹ std)	19.22 ±0.31	22.39 ±2.64	22.88 ±2.65	22.41 ±1.32	21.70 ±0.77
Productividad (10⁹ céls.L⁻¹.día⁻¹)	5.77	6.72	6.72	6.86	6.51
% proteína en F.O.	45.64	50.39	47.82	46.82	47.64
% carboh. en F.O.	24.15	23.17	20.61	21.79	21.21
% lípidos en F.O.	30.20	26.43	31.57	31.38	31.14
Proteína (pg.cél⁻¹ ± std)	6,30a ±0.082	8,39d ±0.11	8,40d ±0.41	7,75cd ±0.089	7,53bc ±0.029
Carbohidratos (pg.cél⁻¹ ± std)	3,33a ±0.30	3,86d ±0.77	3,62bc ±0.37	3,60c ±0.72	3,35a ±0.58
Lípidos (pg.cél⁻¹ ± std)	4,17a ±0.16	4,40ab ±0.72	5,55d ±0.40	5,19cd ±0.12	4,92bc ±0.48
Peso orgánico (pg.cel⁻¹)	13,8	16,65	17,57	16,54	15,8
Valor calórico (10⁻⁷ J.cél⁻¹)	3,73	4,41	4,83	4,53	4,32
Peso seco (µg.mL⁻¹ ±std)	369,86 ±1,47	448,40 ±7,40	520,07 ±16,8	592,33 ±6,47	595,83 ±15,80
Peso seco (pg.cél⁻¹ ±std)	15,95a ±1,76	19,60b ±1,33	21,07e ±1,75	20,46d ±1,28	19,88c ±1,73
Cenizas (pg.cél⁻¹ ±std)	2,15a ±0,18	2,95b ±0,104	3,50c ±0,51	3,92d ±0,27	4,08e ±0,75
Matéria Orgánica (pg.cél⁻¹ ±std)	13,80a ±0,91	16,65c ±1,38	17,57d ±0,75	16,54c ±1,32	15,80b ±1,76
Tasa Máxima Crecimiento (div.día⁻¹)	2,20	2,41	2,37	1,76	1,43
Nitrógeno Residual (mM ± std)	2.69 ±0.52	2.45 ±0.42	2.87 ±0.53	2.12 ±0.69	2.40 ±0.38
Q_N celular (pg)	0,764a ±0.059	0,869b ±0.035	0,974c ±0.010	0,926bc ±0.026	0,906bc ±0.029
Q_C celular (pg)	6,377a ±0.836	7,006b ±0.366	7,632c ±0.208	7,269bc ±0.236	7,136 ±0.187
RelaciónC:N(átomos)	8,35b	8,06ab	7,83a	7,85ab	7,88ab
Absorción Atómica Si (fg.cél⁻¹ ± std)	3,9b ±0,20	4,1b ±0,61	5,1c ±0,26	5,3c ±0,16	1,4a ±0,12

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

Tabla 10
Cultivo en semicontinuo de *Phaeodactylum tricornutum* + SELENIO
Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L
Tasa de renovación 30%.día⁻¹

	0 mM	0.1 mM	1.0 mM	10.0 mM	100.0 mM
Densidad celular (10 ⁶ cél.mL ⁻¹ ± std)	18.28 ±1.58	19.33 ±1.81	22,40 ±1.32	20.90 ±1.12	MC*
Productividad (10 ⁹ céls.L ⁻¹ .día ⁻¹)	5,42	5,79	6,36	6.27	
% proteína en F.O.	46.03	46.94	50.69	51.82	-----
% carboh. en F.O.	23.16	24.08	23.82	26.30	-----
% lípidos en F.O.	30.81	28.97	25.49	21.88	-----
Proteína (pg.cél ⁻¹ ±std)	7.74a ±0.92	7.94a ±0.11	9.18b ±0.072	8.48ab ±0.13	-----
Carbohidratos (pg.cél ⁻¹ ± std)	3.90a ±0.38	4.07a ±0.46	4.31b ±0.34	4.30ab ±0.28	-----
Lípidos (pg.cél ⁻¹ ± std)	5.18d ±0.089	4.90c ±0.19	4.62b ±0.14	3.58a ±0.071	-----
Peso orgánico (pg.cél⁻¹)	16,82	16,91	18.11	16,36	
Valor calórico (10 ⁻⁷ J.cél ⁻¹)	4.57	4.54	4.76	4.18	
Peso seco (µg.mL⁻¹ ±std)	419,33 ±17,52	446,50 ±12,72	474,70 ±2,52	612,37 ±29,79	
Peso seco (pg.cel⁻¹ ±std)	19,37a ±1,86	20,10b ±1,66	22,16d ±1,13	20,62c ±1,42	
Cenizas (pg.cel⁻¹ ±std)	2,55a ±0,12	3,19b ±0,21	4,05c ±0,60	4,26d ±0,78	
Materia Orgánica (pg.cel⁻¹ ±std)	16,82b ±0,95	16,91b ±1,56	18,11c ±1,47	16,36a ±1,26	
Tasa Máxima Crecimiento (div.día ⁻¹)	2,15	2,22	2,19	2,29	2,21
Nitrógeno Residual (mM ± std)	2.81 ±0.35	2.92 ±0.249	2.84 ±0.285	2.60 ±0.120	-----
Q_N celular (pg)	0,840ab ±0.056	0,868ab ±0.079	0,876b ±0.051	0,770a ±0.0674	
Q_C celular (pg)	6,072ab ±0.409	6,126ab ±0.227	6,531b ±0.115	5,570c ±0.294	
RelaciónC:N(átomos)	7,23ab	7,06a	7,45b	7,23ab	
Absorción Atómica Se (fg.cél ⁻¹ ±std)	1,5a ±0.13	2,1b ±0.15	4,9c ±0.31	14,0d ±1.18	Toxicidad

MC*= Muerte celular. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 11
Coeficientes de Correlación r^2 en *Phaeodactylum tricornutum*

	Elementos							
	Fe^{3+}	S^{2-}	Zn^{2+}	Cu^{2+}	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Si^{4+}	Se^{2-}
Densidad celular ($10^6 \text{ cél.mL}^{-1} \pm \text{std}$) CD	0,94	0,87	0,94	0,98	0,85	0,93	0,91	0,99
Densidad celular ($10^6 \text{ cél.mL}^{-1} \pm \text{std}$) CS	0,91	0,91	0,82	0,90	0,68	0,57	0,92	0,94
Proteína ($\text{pg.célula}^{-1} \pm \text{std}$) CS	0,87	0,93	0,87	0,73	0,94	0,94	0,78	0,64
Carbohidratos ($\text{pg.célula}^{-1} \pm \text{std}$) CS	0,70	0,82	0,68	0,73	0,76	0,67	0,70	0,96
Lípidos ($\text{pg.célula}^{-1} \pm \text{std}$) CS	0,77	0,66	0,79	0,96	0,60	0,87	0,77	0,98
Peso seco ($\text{pg.cél}^{-1} \pm \text{std}$) CS	0,84	0,96	0,96	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99
Cenizas $\text{pg.cél}^{-1} \pm \text{std}$ CS	0,80	0,96	0,95	0,99	0,92	0,95	0,96	0,99
Materia Orgánica pg.cél^{-1} $\pm \text{std}$. CS	0,85	0,96	0,96	0,99	0,98	0,86	0,90	0,92
Absorción Atómica ($\text{fg.célula}^{-1} \pm \text{std}$) CS	0,83	0,92	0,90	0,95	0,85	0,77	0,75	0,99
% EPA vs [elemento]	0,82	0,76	0,92	0,34	0,98	0,60	0,73	0,81
% Ácidos Grasos Sat+Monoinsaturados	0,83	0,92	0,63	0,49	0,96	0,72	0,70	0,99
% Ácidos Grasos Poliinsaturados	0,80	0,92	0,74	0,48	0,98	0,72	0,70	0,94
% ω -3/ ω -6 vs [elemento]	0,85	0,76	0,64	0,80	0,86	0,65	0,73	0,73
%EPA:ARA vs [elemento]	0,91	0,95	0,73	0,92	0,87	0,72	0,67	0,90

Tabla 12. Composición de Ácidos Grasos (% del total A.G.), ácidos grasos x célula (A.G. pg.cél⁻¹) y lípidos totales x célula (pg.cél⁻¹) en *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes concentraciones mM de Hierro.

Acido Graso	[0]			[0,1]			[1,0]			[10,0]			[20,0]			[100,0]		
	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	
14:0	5.85±0.6	0.107±0.02	4.44±0.10	0.088±0.00	0.088±0.00	7.33±0.99	0.188±0.01	6.42±0.29	0.160±0.01	7.93±0.4	0.399±0.036	7.35±0.18	0.157±0.03					
15:0	0.50±0.0	0.009±0.00	0.61±0.03	0.012±0.00	0.012±0.00	0.69±0.03	0.017±0.00	0.73±0.05	0.018±0.00	0.57±0.16	0.028±0.005	0.73±0.05	0.015±0.00					
16:0	26.34±2.3	0.47±0.048	27.09±1.0	0.53±0.065	0.53±0.065	21.05±2.9	0.54±0.016	22.91±0.25	0.57±0.007	26.20±1.33	1.322±0.125	23.17±1.1	0.493±0.03					
16:1(n-7)	44.52±0.6	0.80±0.010	39.79±2.3	0.78±0.013	0.78±0.013	42.25±4.9	1.085±0.13	42.27±1.01	1.051±0.01	45.98±1.87	2.319±0.24	48.45±2.1	1.036±0.13					
16:2(n-6)	0.67±0.05	0.01±0.003	0.71±0.05	0.014±0.00	0.014±0.00	0.64±0.01	0.016±0.00	0.75±0.03	0.019±0.00	0.77±0.01	0.038±0.001	0.74±0.08	0.016±0.00					
16:2(n-4)	1.31±0.16	0.02±0.013	1.16±0.62	0.023±0.00	0.023±0.00	2.31±0.02	0.058±0.01	2.05±0.25	0.051±0.01	1.98±0.28	0.098±0.000	2.34±0.30	0.050±0.00					
16:3(n-3)	3.64±0.37	0.07±0.002	3.54±0.73	0.07±0.002	0.07±0.002	5.26±0.28	0.13±0.017	4.53±0.49	0.113±0.02	3.92±0.36	0.194±0.006	4.93±0.33	0.105±0.01					
18:0	4.88±0.13	0.09±0.005	5.42±0.36	0.08±0.007	0.08±0.007	2.37±0.28	0.06±0.001	2.57±0.26	0.064±0.00	2.00±0.24	0.099±0.006	1.03±0.09	0.022±0.00					
18:1(n-9)	4.20±0.51	0.07±0.001	4.74±0.31	0.093±0.00	0.093±0.00	2.25±0.27	0.056±0.00	1.66±0.18	0.041±0.00	1.04±0.10	0.052±0.004	1.20±0.12	0.026±0.00					
18:1(n-7)	2.29±0.25	0.04±0.003	2.68±0.13	0.052±0.00	0.052±0.00	1.01±0.12	0.025±0.00	1.04±0.13	0.026±0.00	0.78±0.08	0.039±0.003	0.95±0.09	0.020±0.00					
18:2(n-6)	1.33±0.06	0.02±0.005	1.71±0.11	0.034±0.00	0.034±0.00	1.64±0.14	0.041±0.00	1.36±0.14	0.034±0.00	1.04±0.14	0.052±0.008	1.31±0.09	0.028±0.00					
18:3(n-6)	0.25±0.03	0.004±0.00	0.46±0.02	0.014±0.00	0.014±0.00	0.97±0.03	0.024±0.00	0.72±0.03	0.018±0.00	0.40±0.03	0.020±0.001	0.58±0.01	0.012±0.00					
18:4(n-3)	0.17±0.02	0.003±0.00	0.78±0.09	0.015±0.00	0.015±0.00	0.09±0.00	0.002±0.00	0.60±0.02	0.015±0.00	0.59±0.06	0.029±0.002	0.56±0.07	0.012±0.00					
20:0	0.51±0.03	0.009±0.00	1.16±0.07	0.051±0.00	0.051±0.00	0.69±0.06	0.018±0.00	0.46±0.05	0.011±0.00	0.07±0.00	0.003±0.000	0.16±0.04	0.003±0.00					
20:2(n-9)	---	---	---	---	---	0.19±0.02	0.005±0.00	0.14±0.02	0.004±0.00	0.09±0.00	0.004±0.000	0.10±0.01	0.002±0.00					
20:3(n-5)	---	---	---	---	---	0.19±0.01	0.004±0.00	0.12±0.01	0.003±0.00	0.09±0.00	0.004±0.000	0.10±0.01	0.002±0.00					
20:4(n-6)	0.36±0.01	0.002±0.00	0.25±0.0	0.001±0.0	0.001±0.0	0.93±0.06	0.024±0.00	0.70±0.03	0.017±0.00	0.79±0.026	0.015±0.001	0.41±0.03	0.009±0.00					
20:4(n-3)	0.47±0.03	0.005±0.00	0.37±0.04	0.007±0.0	0.007±0.0	0.23±0.03	0.007±0.00	0.24±0.01	0.006±0.00	0.14±0.019	0.007±0.000	0.14±0.01	0.003±0.00					
20:5(n-3)	3.46±0.17	0.061±0.00	4.57±0.10	0.091±0.00	0.091±0.00	9.62±0.40	0.236±0.02	9.98±0.61	0.238±0.02	10.58±1.13	0.299±0.030	5.73±0.11	0.121±0.01					
20:5(n-3)	3.46±0.17	0.061±0.00	4.57±0.10	0.091±0.00	0.091±0.00	9.62±0.40	0.236±0.02	9.98±0.61	0.238±0.02	10.58±1.13	0.299±0.030	5.73±0.11	0.121±0.01					
22:0	0.07±0.00	0.001±0.00	0.53±0.03	0.011±0.00	0.011±0.00	0.02±0.00	0.0005±0.0	0.95±0.07	0.023±0.00	0.08±0.00	0.004±0.000	0.03±0.00	0.0006±0.0					
22:3	0.01±0.00	0.0002±0.0	---	---	---	0.16±0.02	0.004±0.00	0.20±0.02	0.005±0.00	0.25±0.00	0.006±0.000	---	---					
22:6(n-6)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.0003±0.0	0.0002±0.00	---	---					
Saturados +	38.16±4.36	0.69±0.014	39.25±3.52	0.77±0.013	0.77±0.013	32.15±2.45	0.824±0.02	34.03±2.37	0.846±0.05	36.84±2.65	1.855±0.133	32.46±0.3	0.692±0.05					
Monounsaturados	50.59±1.6f	0.91±0.010	47.22±2.0e	0.93±0.015	0.93±0.015	45.51±4.5d	1.17±0.28	44.96±1.3c	1.118±0.03	47.80±1.9b	2.411±0.245	50.60±2.1a	1.082±0.13					
Poliinsaturados	11.25±0.1a	0.20±0.026	13.18±1.5b	0.27±0.017	0.27±0.017	16.37±2.0c	0.552±0.08	22.15±0.4d	0.523±0.06	22.34±2.3d	0.762±0.055	16.94±1.4c	0.360±0.03					
ω-3	7.74±0.97	0.14±0.015	9.26±0.90	0.183±0.05	0.183±0.05	15.24±1.75	0.376±0.03	15.36±0.38	0.378±0.03	15.23±1.70	0.530±0.041	11.36±1.1	0.242±0.02					
ω-6	2.35±0.15	0.04±0.001	2.93±0.29	0.062±0.00	0.062±0.00	4.18±0.42	0.105±0.01	3.53±0.82	0.088±0.00	2.50±0.32	0.125±0.015	3.05±0.15	0.065±0.00					
ω-3/ω-6	3.26±0.4a	3.26±0.379	3.16±0.36a	3.16±0.250	3.16±0.250	3.65±0.4b	3.65±0.36	4.35±0.5d	4.35±0.48	6.09±0.3d	6.09±0.26	3.72±0.4c	3.72±0.345					
EPA	3.46±0.17a	0.06±0.004	4.57±0.10c	0.09±0.003	0.09±0.003	9.62±0.66d	0.236±0.02	9.98±0.61d	0.238±0.02	10.58±1.13e	0.299±0.035	5.73±0.10b	0.121±0.01					
EPA:ARA	9,61±0.5a	---	18,28±0.9	---	---	10,34±0.9b	---	14,26±1.0d	---	13,39±0.8c	---	13,97±0.5c	---					
Total A.G.	±	1.803±0.2a	±	1.96±0.1b	±	±	2.543±0.2d	±	2.487±0.0d	±	3.03±0.5e	±	2.134±0.2c					
Total Lípidos	±	7.95±0.18	±	3.88±0.06	±	±	3.55±0.08	±	3.49±0.12	±	3.41±0.16	±	3.49±0.07					

A.G.: ácido graso, EPA, eicosapentaenoico, ---: no detectado. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0.05).

A.G. ácido graso, EPA, eicosapentaenoico, --- no detectado. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0,05).

Tabla 13. Composición de Ácidos Grasos (% del total A.G.), ácidos grasos x célula (A.G. pg.cél^{-1}) y lípidos totales x célula (pg.cél^{-1}) en *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes concentraciones **mm de Azufre**.

Acido Graso	[0]			[0,1]			[1,0]			[10,0]			[100,0]		
	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	
14:0	7.64±0.68	0.123±0.012	7.37±0.11	0.144±0.010	0.144±0.010	6.58±0.11	0.202±0.036	0.202±0.036	7.39±0.42	0.104±0.003	0.104±0.003	9.74±0.43	0.076±0.005		
15:0	0.62±0.14	0.010±0.001	0.65±0.04	0.013±0.002	0.013±0.002	0.44±0.04	0.014±0.001	0.014±0.001	0.75±0.01	0.011±0.002	0.011±0.002	0.47±0.07	0.004±0.000		
16:0	25.82±1.24	0.414±0.059	25.12±2.54	0.498±0.049	0.498±0.049	23.81±2.89	0.730±0.023	0.730±0.023	30.96±2.28	0.435±0.022	0.435±0.022	31.29±1.21	0.161±0.010		
16:1(n-7)	42.82±1.31	0.686±0.083	44.88±1.90	0.885±0.087	0.885±0.087	33.48±0.39	1.028±0.019	1.028±0.019	16.19±1.67	0.229±0.026	0.229±0.026	29.78±2.29	0.229±0.016		
16:2(n-6)	0.97±0.10	0.015±0.000	0.71±0.09	0.014±0.002	0.014±0.002	0.93±0.05	0.029±0.002	0.029±0.002	0.61±0.08	0.008±0.000	0.008±0.000	1.11±0.19	0.005±0.000		
16:2(n-4)	2.34±0.17	0.037±0.001	2.05±0.09	0.040±0.003	0.040±0.003	3.21±0.45	0.099±0.004	0.099±0.004	1.25±0.16	0.018±0.003	0.018±0.003	1.14±0.19	0.005±0.000		
16:3(n-3)	4.43±0.46	0.070±0.006	4.40±0.28	0.086±0.006	0.086±0.006	7.46±0.13	0.300±0.013	0.300±0.013	4.02±0.52	0.057±0.009	0.057±0.009	7.90±0.48	0.057±0.004		
18:0	2.64±0.25	0.042±0.002	1.75±0.17	0.036±0.002	0.036±0.002	2.79±0.18	0.215±0.025	0.215±0.025	26.61±2.88	0.374±0.032	0.374±0.032	3.84±0.39	0.030±0.002		
18:1(n-9)	1.07±0.03	0.017±0.001	1.40±0.13	0.028±0.002	0.028±0.002	1.19±0.12	0.036±0.003	0.036±0.003	1.40±0.08	0.020±0.002	0.020±0.002	1.49±0.14	0.009±0.000		
18:1(n-7)	0.82±0.04	0.013±0.001	0.81±0.01	0.016±0.003	0.016±0.003	1.00±0.15	0.031±0.003	0.031±0.003	0.98±0.04	0.014±0.001	0.014±0.001	0.89±0.06	0.006±0.000		
18:2(n-6)	1.12±0.14	0.018±0.002	1.27±0.13	0.025±0.002	0.025±0.002	1.49±0.13	0.046±0.001	0.046±0.001	1.09±0.02	0.015±0.001	0.015±0.001	2.18±0.14	0.014±0.001		
18:3(n-6)	0.38±0.03	0.006±0.000	0.54±0.01	0.011±0.002	0.011±0.002	0.48±0.01	0.015±0.000	0.015±0.000	0.26±0.02	0.004±0.000	0.004±0.000	0.54±0.02	0.003±0.000		
18:4(n-3)	0.51±0.06	0.008±0.000	0.65±0.01	0.013±0.001	0.013±0.001	0.52±0.05	0.016±0.001	0.016±0.001	0.70±0.09	0.010±0.001	0.010±0.001	0.31±0.02	0.002±0.000		
20:0	0.41±0.05	0.006±0.000	0.07±0.00	0.002±0.000	0.002±0.000	0.53±0.02	0.016±0.001	0.016±0.001	1.50±0.12	0.021±0.001	0.021±0.001	1.20±0.13	0.008±0.000		
20:2(n-9)	0.10±0.01	0.001±0.000	0.12±0.01	0.002±0.000	0.002±0.000	0.10±0.01	0.003±0.000	0.003±0.000	0.05±0.00	0.001±0.000	0.001±0.000	0.14±0.01	0.001±0.000		
20:3(n-5)	0.10±0.02	0.002±0.000	0.10±0.01	0.002±0.000	0.002±0.000	0.20±0.01	0.006±0.000	0.006±0.000	0.13±0.01	0.002±0.000	0.002±0.000	0.33±0.02	0.002±0.000		
20:4(n-6)	0.62±0.01	0.005±0.000	0.44±0.01	0.009±0.000	0.009±0.000	0.46±0.14	0.033±0.001	0.033±0.001	0.65±0.03	0.009±0.000	0.009±0.000	1.48±0.17	0.008±0.000		
20:4(n-3)	0.16±0.02	0.002±0.000	0.20±0.02	0.004±0.000	0.004±0.000	0.11±0.01	0.004±0.000	0.004±0.000	0.46±0.03	0.006±0.000	0.006±0.000	0.27±0.02	0.001±0.000		
20:5(n-3)	7.52±0.76	0.120±0.010	8.00±0.20	0.145±0.039	0.145±0.039	14.01±1.15	0.371±0.039	0.371±0.039	4.70±0.10	0.066±0.002	0.066±0.002	9.78±0.87	0.081±0.003		
22:0	0.07±0.00	0.001±0.000	0.07±0.00	0.002±0.000	0.002±0.000	0.18±0.015	0.006±0.000	0.006±0.000	0.16±0.01	0.002±0.000	0.002±0.000	0.52±0.05	0.002±0.000		
22:3	0.14±0.01	0.002±0.000	0.13±0.00	0.003±0.000	0.003±0.000	0.35±0.01	0.011±0.000	0.011±0.000	0.09±0.007	0.001±0.000	0.001±0.000	0.36±0.03	0.002±0.000		
22:6(n-3)	0.0009±0.0	0.000±0.000	0.004±0.0	0.0001±0.00	0.0001±0.00	0.07±0.01	0.002±0.000	0.002±0.000	0.04±0.00	0.006±0.000	0.006±0.000	0.0008±0.0	0.000±0.000		
Saturados +	37.19±2.59	0.596±0.058	35.03±3.02	0.694±0.012	0.694±0.012	34.33±0.22	1.183±0.124	1.183±0.124	67.38±5.60	0.948±0.06	0.948±0.06	47.06±3.92	0.388±0.000		
Monounsaturados	44.71±1.3ab	0.716±0.080	47.08±2.02b	0.928±0.098	0.928±0.098	35.67±0.98a	1.095±0.020	1.095±0.020	18.57±1.19ab	0.262±0.03	0.262±0.03	33.03±3.85ab	0.342±0.000		
Poliinsaturados	18.10±2.0a	0.288±0.020	18.71±0.75b	0.355±0.063	0.355±0.063	30.00±2.2e	0.793±0.029	0.793±0.029	14.05±1.41c	0.198±0.025	0.198±0.025	19.91±0.15c	0.232±0.000		
ω-3	12.62±1.45	0.201±0.016	13.25±0.39	0.249±0.025	0.249±0.025	22.10±1.50	0.690±0.020	0.690±0.020	9.92±0.15	0.139±0.012	0.139±0.012	18.26±1.14	0.138±0.000		
ω-6	2.80±0.24	0.044±0.004	2.97±0.26	0.059±0.004	0.059±0.004	3.96±0.21	0.124±0.014	0.124±0.014	2.61±0.00	0.037±0.001	0.037±0.001	5.31±0.00	0.039±0.000		
ω-3/ω-6	4.51±0.14d	4.51±0.14	4.46±0.19b	4.46±0.19	4.46±0.19	5.58±0.37c	5.58±0.37	5.58±0.37	3.80±0.43a	3.80±0.43	3.80±0.43	3.44±0.28c	3.44±0.58		
EPA	7.52±0.76b	0.120±0.010	8.00±0.20b	0.145±0.01	0.145±0.01	14.01±1.15d	0.301±0.019	0.301±0.019	4.70±0.10a	0.066±0.002	0.066±0.002	9.78±0.87c	0.101±0.000		
EPA:ARA	12,12±0.17c	18,18±0.6d	18,18±0.6d	19,77±0.13d	19,77±0.13d	21,26±1.1e	3,071±0.03e	3,071±0.03e	7,23±0.3a	1,408±0.03b	1,408±0.03b	9,47±0.3b	±		
Total A.G.	±	1,601±0.16c	±	1,977±0.13d	1,977±0.13d	±	3,071±0.03e	3,071±0.03e	±	1,408±0.03b	1,408±0.03b	±	0.963±0.00a		
Total Lípidos	±	3,42±0.15	±	3,46±0.12	3,46±0.12	±	4,81±0.45	4,81±0.45	±	4,76±0.19	4,76±0.19	±	2.59±0.26		

A.G. ácido graso, EPA, eicosapentaénico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (*p*<0.05).

A.G. ácido graso, EPA, eicosapentaenoico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

Tabla 14. Composición de Ácidos Grasos (% del total A.G.), ácidos grasos x célula (A.G. pg.cél⁻¹) y lípidos totales x célula (pg.cél⁻¹) en *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes concentraciones **mM de Zinc**.

Acido Graso	[0]			[0,1]			[1,0]			[10,0]			[100,0]		
	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.
14:0	6.92±0.10	0.170±0.016	9.00±0.74	0.325±0.010	0.325±0.010	17.43±0.80	0.176±0.015	0.176±0.015	13.64±1.39	0.155±0.013	0.155±0.013	13.70±1.49	0.185±0.074	0.185±0.074	0.185±0.074
15:0	0.75±0.02	0.018±0.003	0.77±0.08	0.028±0.003	0.028±0.003	0.68±0.03	0.007±0.001	0.007±0.001	0.78±0.08	0.009±0.000	0.009±0.000	0.70±0.08	0.009±0.000	0.009±0.000	0.009±0.000
16:0	29.17±1.86	0.734±0.033	42.65±4.07	1.556±0.131	1.556±0.131	38.12±1.65	0.386±0.011	0.386±0.011	33.09±2.30	0.377±0.038	0.377±0.038	33.51±2.00	0.447±0.015	0.447±0.015	0.447±0.015
16:1(n-7)	35.83±3.47	0.883±0.030	31.43±1.24	1.152±0.120	1.152±0.120	30.56±0.87	0.307±0.037	0.307±0.037	29.48±0.66	0.339±0.039	0.339±0.039	27.52±0.45	0.366±0.012	0.366±0.012	0.366±0.012
16:2(n-6)	0.51±0.03	0.013±0.000	0.16±0.019	0.006±0.000	0.006±0.000	0.29±0.016	0.003±0.000	0.003±0.000	0.60±0.02	0.006±0.000	0.006±0.000	0.27±0.02	0.003±0.000	0.003±0.000	0.003±0.000
16:2(n-4)	1.91±0.12	0.047±0.003	1.00±0.17	0.038±0.003	0.038±0.003	1.56±0.07	0.016±0.001	0.016±0.001	2.73±0.25	0.033±0.001	0.033±0.001	1.75±0.08	0.023±0.002	0.023±0.002	0.023±0.002
16:3(n-3)	3.22±0.10	0.078±0.002	1.75±0.12	0.065±0.005	0.065±0.005	1.79±0.03	0.018±0.001	0.018±0.001	3.27±0.28	0.039±0.002	0.039±0.002	3.05±0.40	0.041±0.002	0.041±0.002	0.041±0.002
18:0	1.76±0.12	0.043±0.000	1.13±0.18	0.043±0.004	0.043±0.004	0.36±0.02	0.004±0.000	0.004±0.000	0.90±0.02	0.011±0.001	0.011±0.001	0.72±0.02	0.009±0.000	0.009±0.000	0.009±0.000
18:1(n-9)	2.91±0.25	0.071±0.008	1.87±0.10	0.069±0.004	0.069±0.004	0.54±0.01	0.006±0.000	0.006±0.000	1.08±0.14	0.013±0.001	0.013±0.001	1.35±0.14	0.017±0.001	0.017±0.001	0.017±0.001
18:1(n-7)	1.23±0.14	0.030±0.002	0.61±0.06	0.024±0.002	0.024±0.002	0.36±0.07	0.004±0.000	0.004±0.000	0.91±0.03	0.011±0.001	0.011±0.001	0.61±0.01	0.008±0.001	0.008±0.001	0.008±0.001
18:2(n-6)	1.85±0.13	0.045±0.005	0.90±0.07	0.034±0.003	0.034±0.003	0.97±0.01	0.010±0.001	0.010±0.001	1.91±0.15	0.023±0.001	0.023±0.001	1.75±0.09	0.023±0.002	0.023±0.002	0.023±0.002
18:3(n-6)	0.73±0.03	0.018±0.001	0.42±0.04	0.016±0.001	0.016±0.001	0.10±0.01	0.001±0.000	0.001±0.000	0.29±0.01	0.003±0.000	0.003±0.000	0.30±0.00	0.004±0.000	0.004±0.000	0.004±0.000
18:4(n-3)	0.56±0.06	0.014±0.000	0.35±0.03	0.014±0.001	0.014±0.001	0.09±0.00	0.001±0.000	0.001±0.000	0.22±0.05	0.003±0.000	0.003±0.000	0.21±0.03	0.003±0.000	0.003±0.000	0.003±0.000
20:0	0.15±0.02	0.004±0.000	0.08±0.00	0.003±0.000	0.003±0.000	0.03±0.00	0.0004±0.00	0.0004±0.00	0.08±0.00	0.001±0.000	0.001±0.000	0.06±0.00	0.001±0.000	0.001±0.000	0.001±0.000
20:2(n-9)	0.27±0.02	0.007±0.000	0.12±0.01	0.005±0.000	0.005±0.000	0.08±0.00	0.001±0.00	0.001±0.00	0.21±0.03	0.002±0.000	0.002±0.000	0.21±0.02	0.003±0.000	0.003±0.000	0.003±0.000
20:3(n-5)	0.17±0.02	0.004±0.000	0.08±0.00	0.003±0.000	0.003±0.000	0.05±0.00	0.0005±0.00	0.0005±0.00	0.09±0.00	0.001±0.000	0.001±0.000	0.13±0.01	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000
20:4(n-6)	0.76±0.04	0.018±0.001	0.54±0.02	0.020±0.001	0.020±0.001	0.45±0.04	0.004±0.000	0.004±0.000	1.05±0.14	0.012±0.000	0.012±0.000	1.76±0.19	0.022±0.002	0.022±0.002	0.022±0.002
20:4(n-3)	0.36±0.03	0.009±0.000	0.24±0.01	0.009±0.000	0.009±0.000	0.13±0.02	0.0013±0.00	0.0013±0.00	0.20±0.03	0.002±0.000	0.002±0.000	0.26±0.02	0.003±0.000	0.003±0.000	0.003±0.000
20:5(n-3)	9.94±0.84	0.243±0.026	10.12±0.10	0.229±0.016	0.229±0.016	5.27±0.56	0.053±0.001	0.053±0.001	7.85±0.16	0.093±0.004	0.093±0.004	7.13±0.41	0.132±0.013	0.132±0.013	0.132±0.013
22:0	0.91±0.08	0.023±0.001	0.82±0.02	0.031±0.001	0.031±0.001	1.10±0.15	0.011±0.001	0.011±0.001	1.58±0.12	0.019±0.001	0.019±0.001	1.94±0.09	0.025±0.002	0.025±0.002	0.025±0.002
22:3	0.09±0.00	0.002±0.000	0.08±0.00	0.003±0.000	0.003±0.000	0.05±0.00	0.0005±0.00	0.0005±0.00	0.04±0.00	0.0006±0.00	0.0006±0.00	0.08±0.00	0.001±0.000	0.001±0.000	0.001±0.000
22:6(n-3)	0.00±0.00	0.0001±0.00	0.00±0.00	0.0001±0.00	0.0001±0.00	0.01±0.00	0.000±0.000	0.000±0.000	0.00±0.00	0.0000±0.00	0.0000±0.00	0.00±0.00	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
Saturados +	39.65±3.41	0.992±0.031	45.67±4.80	1.986±0.14	1.986±0.14	57.72±0.96	0.584±0.016	0.584±0.016	50.08±3.19	0.572±0.013	0.572±0.013	52.31±3.05	0.677±0.023	0.677±0.023	0.677±0.023
Monounsaturados	39.97±4.1a	0.985±0.040	33.91±0.4ab	1.245±0.12	1.245±0.12	31.46±0.7bc	0.317±0.038	0.317±0.038	31.47±0.0a	0.363±0.010	0.363±0.010	29.47±0.1c	0.391±0.012	0.391±0.012	0.391±0.012
Poliinsaturados	20.38±2.3e	0.498±0.010	20.13±2.1d	0.441±0.03	0.441±0.03	10.83±0.5a	0.109±0.013	0.109±0.013	17.54±1.9b	0.220±0.029	0.220±0.029	18.27±1.0c	0.260±0.027	0.260±0.027	0.260±0.027
ω -3	14.08±1.00	0.344±0.038	12.46±0.98	0.317±0.023	0.317±0.023	7.28±0.59	0.073±0.001	0.073±0.001	11.54±1.07	0.138±0.016	0.138±0.016	10.65±1.73	0.179±0.015	0.179±0.015	0.179±0.015
ω -6	3.85±0.39	0.094±0.008	2.02±0.320	0.076±0.006	0.076±0.006	1.81±0.12	0.018±0.001	0.018±0.001	3.84±0.35	0.046±0.002	0.046±0.002	4.08±0.22	0.052±0.001	0.052±0.001	0.052±0.001
ω-3/ω-6	3.66±0.16c	3.66±0.02	6.17±0.10d	6.17±0.10	6.17±0.10	4.02±0.57e	4.02±0.057	4.02±0.057	2.99±0.13a	2.99±0.12	2.99±0.12	2.61±0.03b	2.61±0.34	2.61±0.34	2.61±0.34
EPA	9.94±0.84d	0.243±0.026	10.12±0.10d	0.282±0.019	0.282±0.019	5.27±0.56a	0.053±0.001	0.053±0.001	7.85±0.16c	0.093±0.004	0.093±0.004	7.13±0.41b	0.132±0.013	0.132±0.013	0.132±0.013
EPA:ARA	13.08±0.1d		18.74±0.2e			11.71±0.7c			7.48±0.8b			4.05±0.4a			
Total A.G.	±	2.475±0.16d	±	3.372±0.68e	±	1.010±0.13a	±	1.010±0.13a	±	1.155±0.13b	±	1.328±0.14c	±	1.328±0.14c	1.328±0.14c
Total Lípidos	±	3.42±0.20	±	3.53±0.12	±	2.26±0.33	±	2.26±0.33	±	2.44±0.28	±	1.99±0.12	±	1.99±0.12	1.99±0.12

A.G. ácido graso, EPA, eicosapentaenoico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0.05$).

Tabla 15. Composición de Ácidos Grasos (% del total A.G.), ácidos grasos x célula (A.G. pg.cél⁻¹) y lípidos totales x célula (pg.cél⁻¹) en *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes concentraciones **mM de Cobre**.

Acido Graso	[0]			[0,1]			[1,0]			[10,0]			[100,0]		
	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.
14:0	7.17±0.68	0.144±0.014	5.40±0.66	0.127±0.012	0.127±0.012	5.84±0.59	0.129±0.012	0.129±0.012	5.95±0.77	0.129±0.011	0.129±0.011	5.95±0.77	0.129±0.011	0.129±0.011	0.129±0.011
15:0	0.71±0.02	0.014±0.001	0.53±0.05	0.013±0.001	0.013±0.001	0.59±0.01	0.013±0.001	0.013±0.001	0.58±0.01	0.013±0.001	0.013±0.001	0.58±0.01	0.013±0.001	0.013±0.001	0.013±0.001
16:0	25.26±1.49	0.505±0.023	47.90±4.80	1.138±0.127	1.138±0.127	41.39±2.48	0.911±0.085	0.911±0.085	42.59±3.68	0.926±0.012	0.926±0.012	42.59±3.68	0.926±0.012	0.926±0.012	0.926±0.012
16:1(n-7)	30.01±3.08	0.604±0.02	23.83±2.20	0.547±0.059	0.547±0.059	29.68±1.50	0.652±0.010	0.652±0.010	28.23±2.88	0.608±0.010	0.608±0.010	28.23±2.88	0.608±0.010	0.608±0.010	0.608±0.010
16:2(n-6)	0.55±0.02	0.011±0.001	0.40±0.04	0.009±0.000	0.009±0.000	0.53±0.02	0.012±0.000	0.012±0.000	0.49±0.02	0.011±0.001	0.011±0.001	0.49±0.02	0.011±0.001	0.011±0.001	0.011±0.001
16:2(n-4)	2.27±0.36	0.045±0.001	1.69±0.13	0.040±0.001	0.040±0.001	1.94±0.07	0.043±0.003	0.043±0.003	1.82±0.19	0.039±0.003	0.039±0.003	1.82±0.19	0.039±0.003	0.039±0.003	0.039±0.003
16:3(n-3)	3.51±0.34	0.071±0.03	1.85±0.14	0.043±0.001	0.043±0.001	2.66±0.15	0.058±0.001	0.058±0.001	2.37±0.22	0.051±0.003	0.051±0.003	2.37±0.22	0.051±0.003	0.051±0.003	0.051±0.003
18:0	8.17±0.46	0.160±0.014	1.56±0.13	0.037±0.001	0.037±0.001	1.19±0.08	0.026±0.001	0.026±0.001	1.96±1.65	0.043±0.004	0.043±0.004	1.96±1.65	0.043±0.004	0.043±0.004	0.043±0.004
18:1(n-9)	2.28±0.28	0.045±0.002	1.78±0.05	0.042±0.004	0.042±0.004	1.82±0.12	0.040±0.001	0.040±0.001	1.83±0.22	0.040±0.003	0.040±0.003	1.83±0.22	0.040±0.003	0.040±0.003	0.040±0.003
18:1(n-7)	1.38±0.14	0.027±0.001	1.02±0.12	0.024±0.002	0.024±0.002	1.09±0.12	0.024±0.004	0.024±0.004	0.97±0.05	0.021±0.002	0.021±0.002	0.97±0.05	0.021±0.002	0.021±0.002	0.021±0.002
18:2(n-6)	1.79±0.14	0.036±0.001	1.58±0.22	0.037±0.002	0.037±0.002	1.48±0.02	0.032±0.001	0.032±0.001	1.48±0.13	0.032±0.002	0.032±0.002	1.48±0.13	0.032±0.002	0.032±0.002	0.032±0.002
18:3(n-6)	0.86±0.02	0.017±0.001	0.55±0.01	0.013±0.001	0.013±0.001	0.48±0.01	0.010±0.001	0.010±0.001	0.43±0.01	0.009±0.000	0.009±0.000	0.43±0.01	0.009±0.000	0.009±0.000	0.009±0.000
18:4(n-3)	0.84±0.01	0.017±0.002	0.63±0.02	0.015±0.001	0.015±0.001	0.63±0.06	0.014±0.001	0.014±0.001	0.66±0.02	0.014±0.001	0.014±0.001	0.66±0.02	0.014±0.001	0.014±0.001	0.014±0.001
20:0	0.57±0.02	0.011±0.001	0.14±0.01	0.003±0.000	0.003±0.000	0.10±0.01	0.002±0.000	0.002±0.000	0.11±0.03	0.002±0.000	0.002±0.000	0.11±0.03	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000
20:2(n-9)	0.24±0.02	0.005±0.000	0.18±0.03	0.004±0.000	0.004±0.000	0.15±0.01	0.003±0.000	0.003±0.000	0.15±0.01	0.003±0.000	0.003±0.000	0.15±0.01	0.003±0.000	0.003±0.000	0.003±0.000
20:3(n-5)	0.24±0.02	0.005±0.000	0.12±0.01	0.003±0.000	0.003±0.000	0.11±0.03	0.002±0.000	0.002±0.000	0.10±0.01	0.002±0.000	0.002±0.000	0.10±0.01	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000
20:4(n-6)	0.88±0.02	0.018±0.001	0.91±0.02	0.012±0.001	0.012±0.001	0.68±0.01	0.008±0.000	0.008±0.000	0.74±0.01	0.007±0.000	0.007±0.000	0.74±0.01	0.007±0.000	0.007±0.000	0.007±0.000
20:4(n-3)	0.39±0.04	0.008±0.000	0.27±0.02	0.006±0.000	0.006±0.000	0.28±0.01	0.006±0.000	0.006±0.000	0.31±0.03	0.007±0.001	0.007±0.001	0.31±0.03	0.007±0.001	0.007±0.001	0.007±0.001
20:5(n-3)	8.80±0.57	0.237±0.025	11.87±1.25	0.211±0.02	0.211±0.02	8.83±0.87	0.194±0.012	0.194±0.012	9.18±0.72	0.188±0.003	0.188±0.003	9.18±0.72	0.188±0.003	0.188±0.003	0.188±0.003
22:0	0.12±0.01	0.002±0.000	0.15±0.12	0.028±0.002	0.028±0.002	0.77±0.09	0.017±0.001	0.017±0.001	0.85±0.06	0.018±0.001	0.018±0.001	0.85±0.06	0.018±0.001	0.018±0.001	0.018±0.001
22:3	0.79±0.06	0.015±0.001	0.13±0.02	0.003±0.000	0.003±0.000	0.08±0.00	0.002±0.000	0.002±0.000	0.10±0.01	0.002±0.000	0.002±0.000	0.10±0.01	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000
22:6(n-3)	0.12±0.01	0.002±0.000	0.00±0.00	0.0001±0.00	0.0001±0.00	0.00±0.00	0.0000±0.00	0.0000±0.00	0.01±0.00	0.0001±0.00	0.0001±0.00	0.01±0.00	0.0001±0.00	0.0001±0.00	0.0001±0.00
Saturados +	42.01±1.11	0.837±0.021	56.68±6.52	1.346±0.129	1.346±0.129	49.87±3.12	1.098±0.105	1.098±0.105	52.04±4.09	1.131±0.14	1.131±0.14	52.04±4.09	1.131±0.14	1.131±0.14	1.131±0.14
Monounsaturados	33.67±3.7b	0.677±0.018	16.70±1.7a	0.398±0.013	0.398±0.013	32.59±1.8c	0.715±0.015	0.715±0.015	31.03±3.6d	0.669±0.092	0.669±0.092	31.03±3.6d	0.669±0.092	0.669±0.092	0.669±0.092
Poliinsaturados	24.32±2.83c	0.487±0.010	26.62±2.36d	0.613±0.068	0.613±0.068	17.54±1.27b	0.385±0.014	0.385±0.014	14.40±1.78a	0.368±0.049	0.368±0.049	14.40±1.78a	0.368±0.049	0.368±0.049	0.368±0.049
ω -3	13.66±1.39	0.333±0.037	14.62±1.15	0.276±0.010	0.276±0.010	12.40±0.97	0.272±0.012	0.272±0.012	12.53±0.36	0.261±0.034	0.261±0.034	12.53±0.36	0.261±0.034	0.261±0.034	0.261±0.034
ω -6	4.08±0.48	0.084±0.002	3.03±0.35	0.072±0.002	0.072±0.002	2.87±0.27	0.063±0.004	0.063±0.004	2.75±0.25	0.060±0.001	0.060±0.001	2.75±0.25	0.060±0.001	0.060±0.001	0.060±0.001
ω-3/ω-6	3.35±0.12b	3.35±0.12	4.82±0.34a	4.82±0.34	4.82±0.34	4.33±0.07c	4.325±0.071	4.325±0.071	4.56±0.36d	4.56±0.37	4.56±0.37	4.56±0.36d	4.56±0.37	4.56±0.37	4.56±0.37
EPA	8.80±0.57a	0.211±0.018	11.87±1.25c	0.237±0.025	0.237±0.025	8.83±0.87a	0.194±0.012	0.194±0.012	9.18±0.72b	0.188±0.013	0.188±0.013	9.18±0.72b	0.188±0.013	0.188±0.013	0.188±0.013
EPA:ARA	10.00±0.2a		13.04±1.2c			12.98±1.1c			12.40±1.22b			12.40±1.22b			
Total A.G.	±	2.001±0.07a	±	2.358±0.231d	±	±	2.198±0.07c	±	±	2.168±0.10b	±	±	2.168±0.10b	±	±
Total Lípidos	±	3.99±0.16	±	4.17±0.13	±	±	4.130,16±	±	±	2,97±0.17	±	±	2,97±0.17	±	±

A.G. ácido graso, EPA, eicosapentaenoico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0,05).

Tabla 16. Composición de Ácidos Grasos (% del total A.G.), ácidos grasos x célula (A.G. pg. cél⁻¹) y lípidos totales x célula (pg. cél⁻¹) en *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes concentraciones **mM de Magnesio**.

Acido Graso	[0]			[0,1]			[1,0]			[10,0]			[100,0]		
	%A.G.	pg. cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg. cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg. cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg. cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg. cél ⁻¹	%A.G.
14:0	8.98±0.97	0.157±0.007	10.77±0.00	9.36±0.83	0.247±0.000	9.36±0.83	0.158±0.015	0.158±0.007	10.49±0.66	0.150±0.007	11.89±1.45	0.160±0.016	11.89±1.45	0.160±0.016	0.160±0.016
15:0	0.49±0.05	0.009±0.000	0.53±0.00	0.70±0.01	0.012±0.000	0.70±0.01	0.012±0.004	0.012±0.000	0.74±0.03	0.010±0.000	0.94±0.01	0.013±0.001	0.94±0.01	0.013±0.001	0.013±0.001
16:0	27.20±3.15	0.477±0.02	29.92±0.00	24.86±1.58	0.687±0.000	24.86±1.58	0.418±0.012	0.388±0.018	27.16±1.39	0.388±0.018	25.86±2.43	0.350±0.039	25.86±2.43	0.350±0.039	0.350±0.039
16:1(n-7)	21.08±1.66	0.369±0.045	30.51±0.00	28.02±2.44	0.701±0.000	28.02±2.44	0.470±0.013	0.376±0.022	26.27±1.11	0.376±0.022	30.69±2.37	0.412±0.011	30.69±2.37	0.412±0.011	0.412±0.011
16:2(n-6)	0.63±0.00	0.011±0.001	0.39±0.00	0.66±0.01	0.009±0.000	0.66±0.01	0.011±0.001	0.007±0.000	0.52±0.07	0.007±0.000	0.54±0.01	0.007±0.000	0.54±0.01	0.007±0.000	0.007±0.000
16:2(n-4)	3.89±0.20	0.069±0.007	2.77±0.00	3.80±0.24	0.064±0.000	3.80±0.24	0.063±0.001	0.047±0.005	3.31±0.29	0.047±0.005	3.48±0.38	0.047±0.001	3.48±0.38	0.047±0.001	0.047±0.001
16:3(n-3)	7.02±0.58	0.125±0.012	4.62±0.00	6.19±0.37	0.106±0.000	6.19±0.37	0.103±0.012	0.075±0.008	5.24±0.46	0.075±0.008	4.31±0.45	0.058±0.002	4.31±0.45	0.058±0.002	0.058±0.002
18:0	2.12±0.08	0.038±0.005	1.15±0.00	1.73±0.15	0.026±0.000	1.73±0.15	0.028±0.003	0.024±0.002	1.70±0.15	0.024±0.002	2.13±0.26	0.029±0.002	2.13±0.26	0.029±0.002	0.029±0.002
18:1(n-9)	1.59±0.12	0.028±0.002	0.89±0.00	1.45±0.13	0.020±0.000	1.45±0.13	0.024±0.002	0.020±0.002	1.50±0.11	0.021±0.002	1.89±0.05	0.025±0.001	1.89±0.05	0.025±0.001	0.025±0.001
18:1(n-7)	1.30±0.03	0.023±0.003	0.89±0.00	1.23±0.13	0.020±0.000	1.23±0.13	0.020±0.002	0.017±0.002	1.16±0.15	0.017±0.002	1.21±0.12	0.016±0.001	1.21±0.12	0.016±0.001	0.016±0.001
18:2(n-6)	3.53±0.30	0.063±0.001	2.11±0.00	3.01±0.27	0.048±0.000	3.01±0.27	0.050±0.004	0.039±0.002	2.75±0.10	0.039±0.002	2.74±0.26	0.037±0.003	2.74±0.26	0.037±0.003	0.037±0.003
18:3(n-6)	0.45±0.05	0.008±0.000	0.27±0.00	0.43±0.02	0.006±0.000	0.43±0.02	0.007±0.000	0.005±0.000	0.35±0.03	0.005±0.000	0.37±0.03	0.005±0.000	0.37±0.03	0.005±0.000	0.005±0.000
18:4(n-3)	0.40±0.04	0.007±0.000	0.26±0.00	0.40±0.04	0.006±0.000	0.40±0.04	0.007±0.000	0.006±0.000	0.41±0.02	0.006±0.000	0.29±0.02	0.004±0.000	0.29±0.02	0.004±0.000	0.004±0.000
20:0	0.17±0.02	0.003±0.000	0.11±0.00	0.15±0.01	0.003±0.000	0.15±0.01	0.002±0.000	0.002±0.000	0.15±0.01	0.002±0.000	0.23±0.03	0.003±0.000	0.23±0.03	0.003±0.000	0.003±0.000
20:2(n-9)	0.19±0.01	0.003±0.000	0.13±0.00	0.20±0.01	0.003±0.000	0.20±0.01	0.003±0.000	0.003±0.000	0.22±0.02	0.003±0.000	0.23±0.02	0.003±0.000	0.23±0.02	0.003±0.000	0.003±0.000
20:3(n-5)	0.52±0.01	0.009±0.000	0.34±0.00	0.47±0.05	0.008±0.000	0.47±0.05	0.008±0.000	0.007±0.000	0.50±0.05	0.007±0.000	0.46±0.01	0.006±0.000	0.46±0.01	0.006±0.000	0.006±0.000
20:4(n-6)	1.35±0.14	0.024±0.001	0.79±0.00	1.14±0.13	0.018±0.000	1.14±0.13	0.018±0.001	0.013±0.001	0.94±0.05	0.013±0.001	0.62±0.02	0.008±0.000	0.62±0.02	0.008±0.000	0.008±0.000
20:4(n-3)	0.36±0.03	0.006±0.000	0.28±0.00	0.35±0.02	0.006±0.000	0.35±0.02	0.006±0.000	0.005±0.000	0.35±0.03	0.005±0.000	0.27±0.01	0.004±0.000	0.27±0.01	0.004±0.000	0.004±0.000
20:5(n-3)	11.00±0.70	0.253±0.012	13.60±0.00	15.08±1.31	0.248±0.012	15.08±1.31	0.289±0.030	0.192±0.019	13.43±1.41	0.192±0.019	8.37±0.50	0.114±0.015	8.37±0.50	0.114±0.015	0.114±0.015
22:0	2.51±0.35	0.045±0.001	2.09±0.00	2.16±0.26	0.048±0.000	2.16±0.26	0.036±0.001	0.036±0.003	2.56±0.26	0.036±0.003	3.13±0.42	0.042±0.004	3.13±0.42	0.042±0.004	0.042±0.004
22:3	0.21±0.02	0.004±0.000	0.18±0.00	0.32±0.01	0.004±0.000	0.32±0.01	0.005±0.000	0.003±0.001	0.24±0.02	0.003±0.001	0.33±0.02	0.004±0.000	0.33±0.02	0.004±0.000	0.004±0.000
22:6(n-3)	0.00±0.00	0.0001±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.0001±0.00	0.00±0.00	0.0000±0.00	0.0001±0.00	0.01±0.00	0.0001±0.00	0.01±0.01	0.0001±0.00	0.01±0.01	0.0001±0.00	0.0001±0.00
Saturados +	41.48±4.05	0.728±0.039	44.58±0.00	38.97±1.69	1.024±0.000	38.97±1.69	0.654±0.018	0.611±0.017	42.80±1.74	0.611±0.017	44.18±0.50	0.596±0.011	44.18±0.50	0.596±0.011	0.596±0.011
Monounsaturados	26.07±1.17a	0.420±0.048	32.29±0.00d	30.70±2.89b	0.742±0.000	30.70±2.89b	0.514±0.014	0.414±0.027	28.93±1.35c	0.414±0.027	33.79±2.52e	0.454±0.013	33.79±2.52e	0.454±0.013	0.454±0.013
Poliinsaturados	31.27±3.76e	0.619±0.018	23.13±0.00b	30.33±3.88d	0.531±0.000	30.33±3.88d	0.498±0.049	0.404±0.029	28.27±1.83c	0.404±0.029	22.04±2.68a	0.298±0.029	22.04±2.68a	0.298±0.029	0.298±0.029
ω-3	18.78±2.56	0.496±0.011	18.76±0.00	22.02±2.76	0.371±0.000	22.02±2.76	0.333±0.037	0.278±0.024	19.43±1.60	0.278±0.024	13.25±0.20	0.220±0.015	13.25±0.20	0.220±0.015	0.220±0.015
ω-6	5.96±0.79	0.106±0.013	3.55±0.00	5.24±0.45	0.081±0.000	5.24±0.45	0.086±0.001	0.065±0.003	4.58±0.14	0.065±0.003	4.29±0.49	0.058±0.012	4.29±0.49	0.058±0.012	0.058±0.012
ω-3/ω-6	3.15±0.36b	3.15±0.26	5.28±0.62e	4.20±0.36c	5.28±0.43	4.20±0.36c	4.20±0.36	4.24±0.29d	4.24±0.29d	4.24±0.29	3.09±0.30a	3.09±0.29	3.09±0.30a	3.09±0.29	3.09±0.29
EPA	11.00±0.70b	0.253±0.012	13.60±0.00c	15.08±1.31e	0.248±0.012	15.08±1.31e	0.289±0.03	0.192±0.019	13.43±1.41d	0.192±0.019	8.37±0.50a	0.142±0.015	8.37±0.50a	0.142±0.015	0.142±0.015
EPA:ARA	8.15±0.12a	17.21±0.14d	17.21±0.14d	13.23±0.9b	2.297±0.00	13.23±0.9b	1.667±0.14	1.429±0.03	14.29±0.7c	1.429±0.03	±	1.348±0.08	±	1.348±0.08	1.348±0.08
Total A.G.	±	1.767±0.120	±	±	2.297±0.00	±	1.667±0.14	±	±	1.429±0.03	±	±	±	±	±
Total Lípidos	±	4.24±0.38	±	±	5.10±0.12	±	5.03±0.27	±	±	4.01±0.10	±	±	±	±	±

A.G.: ácido graso, EPA, eicosapentaenoico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0.05$).

Tabla 17. Composición de Ácidos Grasos (% del total A.G.), ácidos grasos x célula (A.G. pg.cél⁻¹) y lípidos totales x célula (pg.cél⁻¹) en *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes concentraciones mM de Calcio.

Acido Graso	[0]			[0,1]			[1,0]			[10,0]			[100,0]		
	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.
14:0	21.62±2.91	0.638±0.020	21.22±0.88	0.727±0.07	20.50±1.62	0.780±0.010	16.42±1.94	0.753±0.042	20.54±1.08	0.535±0.019					
15:0	0.68±0.02	0.020±0.002	0.45±0.05	0.015±0.001	0.76±0.03	0.029±0.001	0.77±0.01	0.034±0.001	0.75±0.03	0.021±0.002					
16:0	29.68±1.82	0.881±0.014	40.60±3.55	1.394±0.14	39.87±0.49	1.516±0.140	34.18±3.20	1.484±0.149	40.19±4.51	1.024±0.13					
16:1(n-7)	29.72±0.92	0.881±0.012	29.85±1.67	1.020±0.01	31.65±1.81	1.201±0.094	31.17±3.27	1.349±0.145	23.55±1.76	0.611±0.02					
16:2(n-6)	0.30±0.028	0.008±0.000	0.09±0.00	0.003±0.000	0.08±0.00	0.003±0.000	0.28±0.03	0.010±0.001	0.17±0.01	0.005±0.000					
16:2(n-4)	1.01±0.12	0.028±0.003	0.56±0.02	0.019±0.001	0.67±0.01	0.025±0.002	2.65±0.16	0.120±0.019	2.39±0.34	0.065±0.003					
16:3(n-3)	5.24±0.69	0.156±0.003	1.82±0.18	0.061±0.002	1.39±0.14	0.052±0.001	2.77±0.15	0.114±0.016	3.56±0.34	0.102±0.017					
18:0	0.19±0.01	0.005±0.000	0.20±0.02	0.007±0.000	0.16±0.01	0.006±0.000	0.33±0.03	0.012±0.001	0.25±0.02	0.005±0.000					
18:1(n-9)	0.77±0.04	0.022±0.001	0.47±0.03	0.016±0.001	0.69±0.03	0.027±0.001	1.33±0.12	0.048±0.003	0.70±0.03	0.019±0.001					
18:1(n-7)	0.18±0.02	0.005±0.000	0.12±0.01	0.004±0.000	0.15±0.01	0.005±0.000	0.41±0.05	0.014±0.001	0.21±0.02	0.005±0.000					
18:2(n-6)	0.71±0.03	0.021±0.002	0.33±0.03	0.011±0.001	0.45±0.01	0.017±0.001	0.88±0.08	0.031±0.002	0.55±0.02	0.015±0.001					
18:3(n-6)	0.13±0.01	0.004±0.000	0.06±0.00	0.002±0.000	0.06±0.00	0.002±0.000	0.40±0.03	0.017±0.001	0.16±0.01	0.005±0.000					
18:4(n-3)	0.08±0.00	0.002±0.000	0.03±0.00	0.001±0.000	0.03±0.00	0.001±0.000	0.08±0.00	0.003±0.000	0.06±0.01	0.002±0.000					
20:0	0.02±0.00	0.0005±0.00	0.01±0.00	0.0004±0.00	0.02±0.00	0.001±0.000	0.07±0.00	0.002±0.000	0.03±0.00	0.001±0.000					
20:2(n-9)	0.24±0.02	0.007±0.000	0.10±0.01	0.003±0.000	0.10±0.01	0.004±0.000	0.20±0.01	0.007±0.000	0.04±0.00	0.001±0.000					
20:3(n-5)	0.06±0.00	0.002±0.000	0.02±0.00	0.0006±0.00	0.03±0.00	0.001±0.000	0.09±0.00	0.003±0.000	0.14±0.01	0.004±0.000					
20:4(n-6)	0.84±0.02	0.025±0.000	0.23±0.01	0.008±0.000	0.49±0.03	0.008±0.000	0.56±0.03	0.021±0.001	0.86±0.06	0.026±0.002					
20:4(n-3)	0.08±0.00	0.002±0.000	0.01±0.00	0.0003±0.00	0.05±0.00	0.002±0.000	0.15±0.01	0.005±0.000	0.04±0.00	0.001±0.000					
20:5(n-3)	4.50±0.10	0.150±0.000	2.67±0.25	0.092±0.002	7.50±0.55	0.222±0.024	5.46±0.58	0.182±0.015	6.24±0.69	0.143±0.010					
22:0	0.95±0.09	0.028±0.001	0.42±0.04	0.014±0.001	0.70±0.03	0.026±0.001	0.69±0.00	0.089±0.009	0.64±0.01	0.017±0.001					
22:3	0.02±0.00	0.0006±0.00	0.02±0.00	0.001±0.000	0.02±0.00	0.001±0.000	0.08±0.00	0.004±0.000	0.25±0.03	0.005±0.000					
22:6(n-3)	0.00±0.00	0.0000±0.00	0.00±0.00	0.0000±0.00	0.00±0.00	0.0001±0.00	0.00±0.00	0.0001±0.00	0.00±0.00	0.0001±0.00					
Saturados +	53.12±4.93	1.573±0.124	60.24±0.00	2.159±0.26	62.01±1.49	2.358±0.234	52.22±4.47	2.373±0.28	62.40±4.12	1.604±0.148					
Monoinsaturados	30.67±1.29a	0.908±0.012	30.44±1.41d	1.041±0.00	32.49±2.05e	1.233±0.107	32.90±3.62b	1.412±0.14	24.45±1.94c	0.635±0.023					
Poliinsaturados	16.21±1.68d	0.479±0.011	8.50±0.00b	0.224±0.010	5.50±0.65a	0.209±0.030	12.65±1.51c	0.518±0.06	12.39±1.02c	0.373±0.025					
ω-3	9.90±1.18	0.383±0.038	6.81±0.00	0.227±0.018	4.34±0.48	0.148±0.013	9.34±0.36	0.357±0.01	10.73±1.16	0.333±0.014					
ω-6	1.98±0.17	0.058±0.002	0.84±0.00	0.028±0.002	0.79±0.08	0.030±0.003	2.84±0.35	0.101±0.01	2.14±0.16	0.068±0.004					
ω-3/ω-6	5.00±0.48c	5.00±0.48	8.10±0.00d	8.10±0.00	5.49±0.38b	5.49±0.38	3.29±0.40a	3.29±0.40	5.01±0.48a	5.01±0.58					
EPA	4.50±0.10b	0.150±0.000	2.67±0.25a	0.092±0.002	7.50±0.55e	0.222±0.024	5.46±0.58c	0.205±0.02	6.24±0.69d	0.194±0.018					
EPA:ARA	5.36±0.2a		11.60±0.9d		15.31±0.6e		9.75±0.5c		7.25±0.6b						
Total A.G.	±	2.960±0.24b	±	3.424±0.16c	±	3.800±0.32d	±	4.301±0.18e	±	2.613±0.09a					
Total Lípidos	±	5.20±0.17	±	6.24±0.16	±	5.33±0.22	±	5.37±0.10	±	5.24±0.42					

A.G.: ácido graso, EPA, eicosapentaénico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0.05).

Tabla 18. Composición de Ácidos Grasos (% del total A.G.), ácidos grasos x célula (A.G. pg.cél^{-1}) y lípidos totales x célula (pg.cél^{-1}) en *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes concentraciones **mM de Silicio**.

Ácido Graso	[0]			[0,1]			[1,0]			[10,0]			[100,0]		
	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.
14:0	14.71±0.91	0.236±0.026	9.65±0.71±	0.169±0.018	11.64±1.03	0.222±0.024	11.70±1.41	0.209±0.007	14.90±0.63	0.138±0.012					
15:0	0.86±0.01	0.014±0.001	0.90±0.01±	0.016±0.003	0.87±0.03	0.017±0.001	0.88±0.08	0.016±0.001	0.83±0.06	0.008±0.000					
16:0	38.36±2.39	0.613±0.014	30.13±0.80±	0.534±0.010	31.58±3.28	0.607±0.030	33.96±2.54	0.608±0.047	35.98±0.75	0.334±0.015					
16:1(n-7)	30.96±0.61	0.494±0.011	31.70±0.52±	0.560±0.059	29.36±3.07	0.566±0.035	28.97±2.17	0.519±0.044	29.40±1.06	0.273±0.023					
16:2(n-6)	0.23±0.02	0.004±0.000	0.57±0.05±	0.010±0.003	0.43±0.02	0.009±0.000	0.37±0.03	0.007±0.000	0.28±0.02	0.003±0.000					
16:2(n-4)	1.04±0.13	0.016±0.000	2.43±0.17±	0.043±0.005	1.49±0.12	0.029±0.002	1.50±0.12	0.027±0.007	1.70±0.02	0.016±0.001					
16:3(n-3)	1.00±0.08	0.015±0.001	2.81±0.27±	0.050±0.001	2.63±0.24	0.052±0.003	2.41±0.29	0.046±0.003	1.42±0.07	0.013±0.000					
18:0	1.66±0.08	0.026±0.000	2.50±0.24±	0.044±0.004	1.57±0.06	0.030±0.002	1.64±0.11	0.030±0.002	2.28±0.16	0.021±0.001					
18:1(n-9)	2.44±0.21	0.038±0.004	2.85±0.35	0.050±0.003	2.88±0.26	0.056±0.002	2.52±0.20	0.045±0.004	2.66±0.12	0.025±0.002					
18:1(n-7)	1.04±0.18	0.016±0.000	1.81±0.14	0.031±0.001	1.01±0.11	0.019±0.002	1.06±0.12	0.019±0.001	1.28±0.05	0.012±0.001					
18:2(n-6)	1.26±0.13	0.019±0.002	2.90±0.19	0.051±0.006	1.58±0.13	0.031±0.003	1.54±0.19	0.028±0.002	1.84±0.13	0.017±0.002					
18:3(n-6)	0.39±0.02	0.004±0.000	0.38±0.05	0.007±0.000	0.57±0.04	0.011±0.001	0.58±0.03	0.011±0.001	0.26±0.02	0.002±0.000					
18:4(n-3)	0.12±0.01	0.002±0.000	0.23±0.01	0.004±0.000	0.26±0.02	0.005±0.000	0.23±0.03	0.004±0.000	0.16±0.01	0.001±0.000					
20:0	0.17±0.02	0.003±0.000	0.25±0.03	0.004±0.000	0.18±0.01	0.003±0.000	0.17±0.01	0.003±0.000	0.20±0.01	0.002±0.000					
20:2(n-9)	0.10±0.01	0.001±0.000	0.26±0.02	0.005±0.000	0.19±0.01	0.004±0.000	0.17±0.02	0.003±0.000	0.21±0.02	0.002±0.000					
20:3(n-5)	0.23±0.01	0.003±0.000	0.61±0.01	0.011±0.001	0.46±0.02	0.009±0.000	0.41±0.02	0.008±0.000	0.26±0.03	0.002±0.000					
20:4(n-6)	0.39±0.02	0.005±0.000	0.72±0.02	0.013±0.001	1.12±0.18	0.026±0.002	0.91±0.05	0.019±0.001	0.46±0.03	0.004±0.000					
20:4(n-3)	0.07±0.00	0.001±0.000	0.15±0.02	0.003±0.000	0.15±0.01	0.003±0.000	0.10±0.01	0.002±0.000	0.07±0.00	0.0007±0.00					
20:5(n-3)	2.94±0.27	0.045±0.002	5.87±0.59	0.106±0.013	9.33±0.66	0.187±0.012	8.30±0.16	0.157±0.019	3.09±0.22	0.029±0.002					
22:0	1.84±0.04	0.029±0.002	2.92±0.21	0.052±0.001	2.28±0.25	0.044±0.001	2.26±0.27	0.040±0.001	2.27±0.34	0.021±0.003					
22:3	0.37±0.03	0.006±0.000	0.33±0.01	0.006±0.000	0.24±0.01	0.005±0.000	0.24±0.02	0.004±0.000	0.43±0.03	0.004±0.000					
22:6(n-3)	0.01±0.00	0.0001±0.00	0.02±0.00	0.0004±0.00	0.00±0.00	0.0001±0.00	0.00±0.00	0.0001±0.00	0.02±0.01	0.0002±0.00					
Saturados +	57.61±3.41	0.921±0.021	46.35±0.02	0.820±0.014	48.13±2.76	0.924±0.056	50.60±4.58	0.906±0.060	56.46±0.59	0.524±0.026					
Monounsaturados	34.44±0.35d	0.548±0.011	36.36±1.30a	0.640±0.069	33.25±2.76a	0.642±0.044	32.55±2.37b	0.584±0.056	33.35±1.19c	0.310±0.026					
Poliinsaturados	7.94±0.75a	0.122±0.014	17.28±1.28d	0.308±0.037	18.63±1.29e	0.371±0.020	16.84±1.49c	0.315±0.015	10.19±0.61b	0.094±0.004					
ω-3	4.13±0.55	0.063±0.003	9.06±0.25	0.163±0.015	12.37±1.34	0.247±0.016	11.04±1.47	0.209±0.012	4.75±0.21	0.044±0.002					
ω-6	2.22±0.27	0.032±0.003	4.59±0.06	0.081±0.001	3.87±0.37	0.077±0.004	3.48±0.38	0.064±0.002	2.85±0.31	0.026±0.002					
ω-3/ω-6	1.87±0.15b	1.87±0.15	1.97±0.25c	1.97±0.25	3.20±0.20d	3.20±0.101	3.19±0.30d	3.19±0.10	1.67±0.12a	1.67±0.12					
EPA	2.94±0.27a	0.045±0.002	5.87±0.59b	0.106±0.013	9.33±0.66d	0.187±0.012	8.30±0.16c	0.157±0.019	3.09±0.22a	0.029±0.002					
EPA:ARA	7.54±0.7b		8.15±0.6c		8.34±0.9d		9.12±0.7e		6.72±0.4a						
Total A.G.	±	1.592±0.13b	±	1.768±0.13c	±	1.937±0.16e	±	1.805±0.12d	±	0.929±0.051a					
Total Lípidos	±	4.17±0.16	±	4.40±0.37	±	5.55±0.40	±	5.19±0.12	±	4.92±0.48					

A.G.: ácido graso, EPA, eicosapentaénico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0.05$).

Tabla 19. Composición de Ácidos Grasos (% del total A.G.), ácidos grasos x célula (A.G. pg.cél⁻¹) y lípidos totales x célula (pg.cél⁻¹) en *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes concentraciones **mM de Selenio**.

Acido Graso	[0]			[0,1]			[1,0]			[10,0]			[100,0]		
	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.
14:0	22.95±1.89	0.752±0.016	12.15±1.26	0.474±0.023	18.39±0.95	0.201±0.023	20.02±0.62	0.178±0.013	20.02±0.62	0.178±0.013	0.178±0.013	20.02±0.62	0.178±0.013	0.178±0.013	20.02±0.62
15:0	0.53±0.04	0.019±0.001	0.93±0.05	0.036±0.002	0.99±0.04	0.011±0.002	0.91±0.02	0.008±0.000	0.91±0.02	0.008±0.000	0.008±0.000	0.91±0.02	0.008±0.000	0.008±0.000	0.91±0.02
16:0	35.72±2.75	1.180±0.130	33.15±0.77	1.263±0.142	39.26±1.08	0.428±0.047	38.04±0.59	0.338±0.05	38.04±0.59	0.338±0.05	0.338±0.05	38.04±0.59	0.338±0.05	0.338±0.05	38.04±0.59
16:1(n-7)	33.03±3.24	1.071±0.100	31.27±2.01	1.185±0.036	24.29±0.46	0.264±0.024	22.97±1.26	0.204±0.029	22.97±1.26	0.204±0.029	0.204±0.029	22.97±1.26	0.204±0.029	0.204±0.029	22.97±1.26
16:2(n-6)	0.09±0.00	0.003±0.000	0.20±0.02	0.015±0.001	0.20±0.02	0.002±0.000	0.30±0.03	0.003±0.000	0.30±0.03	0.003±0.000	0.003±0.000	0.30±0.03	0.003±0.000	0.003±0.000	0.30±0.03
16:2(n-4)	0.69±0.03	0.022±0.010	1.68±0.11	0.064±0.001	2.57±0.28	0.010±0.001	1.22±0.11	0.011±0.001	1.22±0.11	0.011±0.001	0.011±0.001	1.22±0.11	0.011±0.001	0.011±0.001	1.22±0.11
16:3(n-3)	1.54±0.22	0.053±0.004	4.20±0.10	0.162±0.015	1.99±0.19	0.028±0.001	2.81±0.13	0.025±0.002	2.81±0.13	0.025±0.002	0.025±0.002	2.81±0.13	0.025±0.002	0.025±0.002	2.81±0.13
18:0	0.29±0.02	0.009±0.000	1.74±0.17	0.065±0.002	1.63±0.13	0.022±0.001	2.11±0.11	0.019±0.001	2.11±0.11	0.019±0.001	0.019±0.001	2.11±0.11	0.019±0.001	0.019±0.001	2.11±0.11
18:1(n-9)	0.51±0.01	0.016±0.001	1.82±0.18	0.065±0.006	1.63±0.13	0.017±0.001	1.35±0.12	0.012±0.001	1.35±0.12	0.012±0.001	0.012±0.001	1.35±0.12	0.012±0.001	0.012±0.001	1.35±0.12
18:1(n-7)	0.16±0.01	0.005±0.000	0.69±0.06	0.025±0.002	1.38±0.01	0.015±0.003	1.30±0.12	0.011±0.001	1.30±0.12	0.011±0.001	0.011±0.001	1.30±0.12	0.011±0.001	0.011±0.001	1.30±0.12
18:2(n-6)	0.36±0.01	0.012±0.001	0.53±0.03	0.035±0.003	0.51±0.01	0.005±0.000	0.55±0.05	0.005±0.000	0.55±0.05	0.005±0.000	0.005±0.000	0.55±0.05	0.005±0.000	0.005±0.000	0.55±0.05
18:3(n-6)	0.08±0.00	0.003±0.000	0.11±0.03	0.011±0.001	0.06±0.00	0.0007±0.00	0.10±0.01	0.0009±0.00	0.10±0.01	0.0009±0.00	0.0009±0.00	0.10±0.01	0.0009±0.00	0.0009±0.00	0.10±0.01
18:4(n-3)	0.04±0.00	0.001±0.000	0.13±0.02	0.005±0.000	0.07±0.00	0.0008±0.00	0.07±0.00	0.0006±0.00	0.07±0.00	0.0006±0.00	0.0006±0.00	0.07±0.00	0.0006±0.00	0.0006±0.00	0.07±0.00
20:0	0.02±0.00	0.0005±0.00	0.07±0.00	0.002±0.000	0.05±0.00	0.0005±0.00	0.07±0.00	0.0006±0.00	0.07±0.00	0.0006±0.00	0.0006±0.00	0.07±0.00	0.0006±0.00	0.0006±0.00	0.07±0.00
20:2(n-9)	0.02±0.00	0.0007±0.00	0.11±0.01	0.004±0.000	0.07±0.00	0.0007±0.00	0.06±0.00	0.0006±0.00	0.06±0.00	0.0006±0.00	0.0006±0.00	0.06±0.00	0.0006±0.00	0.0006±0.00	0.06±0.00
20:3(n-5)	0.09±0.00	0.003±0.000	0.27±0.01	0.010±0.001	0.16±0.01	0.0017±0.00	0.15±0.01	0.001±0.000	0.15±0.01	0.001±0.000	0.001±0.000	0.15±0.01	0.001±0.000	0.001±0.000	0.15±0.01
20:4(n-6)	0.58±0.02	0.009±0.000	0.63±0.15	0.042±0.002	0.75±0.00	0.008±0.000	1.02±0.12	0.009±0.000	1.02±0.12	0.009±0.000	0.009±0.000	1.02±0.12	0.009±0.000	0.009±0.000	1.02±0.12
20:4(n-3)	0.02±0.00	0.0007±0.00	0.17±0.02	0.006±0.000	0.05±0.00	0.0006±0.00	0.08±0.00	0.0006±0.00	0.08±0.00	0.0006±0.00	0.0006±0.00	0.08±0.00	0.0006±0.00	0.0006±0.00	0.08±0.00
20:5(n-3)	4.20±0.21	0.104±0.076	7.61±0.54	0.286±0.029	5.78±0.57	0.062±0.000	5.74±0.46	0.050±0.004	5.74±0.46	0.050±0.004	0.050±0.004	5.74±0.46	0.050±0.004	0.050±0.004	5.74±0.46
22:0	0.53±0.01	0.017±0.001	1.21±0.14	0.047±0.002	0.82±0.02	0.009±0.000	0.90±0.02	0.008±0.000	0.90±0.02	0.008±0.000	0.008±0.000	0.90±0.02	0.008±0.000	0.008±0.000	0.90±0.02
22:3	0.01±0.00	0.0002±0.00	0.03±0.00	0.001±0.000	0.03±0.00	0.0003±0.00	0.23±0.03	0.002±0.000	0.23±0.03	0.002±0.000	0.002±0.000	0.23±0.03	0.002±0.000	0.002±0.000	0.23±0.03
22:6(n-3)	0.00±0.00	0.0001±0.00	0.00±0.00	0.0000±0.00	0.00±0.00	0.0000±0.00	0.00±0.00	0.0000±0.00	0.00±0.00	0.0000±0.00	0.0000±0.00	0.00±0.00	0.0000±0.00	0.0000±0.00	0.00±0.00
Saturados +	60.05±3.81	1.978±0.15	49.24±4.16	1.888±0.14	61.51±2.29	0.671±0.011	62.05±1.83	0.552±0.045	62.05±1.83	0.552±0.045	0.552±0.045	62.05±1.83	0.552±0.045	0.552±0.045	62.05±1.83
Monounsaturados	33.70±3.31d	1.092±0.10	33.77±3.37a	1.275±0.04	27.30±0.76c	0.297±0.033	25.62±1.18b	0.227±0.032	25.62±1.18b	0.227±0.032	0.227±0.032	25.62±1.18b	0.227±0.032	0.227±0.032	25.62±1.18b
Poliinsaturados	6.25±0.40a	0.212±0.014	16.99±1.79d	0.642±0.006	11.19±1.72b	0.120±0.004	12.33±1.16c	0.108±0.005	12.33±1.16c	0.108±0.005	0.108±0.005	12.33±1.16c	0.108±0.005	0.108±0.005	12.33±1.16c
ω-3	5.80±0.46	0.159±0.012	12.12±0.57	0.460±0.022	7.89±0.11	0.091±0.000	8.69±0.39	0.076±0.002	8.69±0.39	0.076±0.002	0.076±0.002	8.69±0.39	0.076±0.002	0.076±0.002	8.69±0.39
ω-6	0.80±0.03	0.022±0.001	1.47±0.17	0.103±0.013	1.53±0.13	0.016±0.002	1.97±0.13	0.017±0.000	1.97±0.13	0.017±0.000	0.017±0.000	1.97±0.13	0.017±0.000	0.017±0.000	1.97±0.13
ω-3/ω-6	7.25±0.58b	7.25±0.58	8.24±0.5c	8.24±0.6	5.16±0.67c	5.16±0.67	4.41±0.13a	4.41±0.13	4.41±0.13a	4.41±0.13	4.41±0.13	4.41±0.13a	4.41±0.13	4.41±0.13	4.41±0.13
EPA	4.20±0.21a	0.104±0.017	7.61±0.54c	0.286±0.029	5.78±0.58b	0.062±0.001	5.74±0.46b	0.050±0.007	5.74±0.46b	0.050±0.007	0.050±0.007	5.74±0.46b	0.050±0.007	0.050±0.007	5.74±0.46b
EPA:ARA	7.24±0.12b	12.07±1.2d	12.07±1.2d	7.71±0.7c	7.71±0.7c	5.63±0.3a	5.63±0.3a	5.63±0.3a	5.63±0.3a	5.63±0.3a	5.63±0.3a	5.63±0.3a	5.63±0.3a	5.63±0.3a	5.63±0.3a
Total A.G.	±	3.282±0.36c	±	3.806±0.35d	±	1.088±0.14b	±	0.887±0.13a	±	0.887±0.13a	0.887±0.13a	±	0.887±0.13a	0.887±0.13a	±
Total Lípidos	±	5.18±0.19	±	4.90±0.29	±	4.62±0.14	±	3.58±0.27	±	3.58±0.27	3.58±0.27	±	3.58±0.27	3.58±0.27	±

A.G. ácido graso, EPA, eicosapentaenoico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0.05$).

Capítulo 2

Estudio de la incorporación y efecto unitario de los elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en diferentes concentraciones, en el medio de cultivo "ALGAL" (Fábregas *et al.*, 1984), sobre la generación de biomasa y composición bioquímica de ***Isochrysis galbana* var. T-iso** en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.

Introducción

La microalga marina *Isochrysis galbana* posee excelentes características nutritivas, ya que es rica en ácidos grasos poliinsaturados (Reitan *et al.*, 1994), utilizándola comúnmente como alimento en los criaderos de bivalvos (Saoudi-Helis *et al.*, 1994; Sánchez *et al.*, 2000), así como enriquecedor de *Artemia* y rotíferos por su alto perfil de ácido docosahexaenoico (22:6n-3) y en menor escala el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3), (Olsen *et al.*, 1997). *Isochrysis galbana* crece bien en cultivo masivo ya sea al interior o al aire libre (Kaplan *et al.*, 1990). Tal microalga puede cambiar significativamente con las variaciones en las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, caudal de aire, el pH y la intensidad de la luz. Su composición bioquímica puede variar durante la fase de crecimiento, en particular con respecto a sus componentes lipídicos (Sukenik and Carmeli 1990; Hodgson *et al.*, 1991.). En la actualidad, existen varios medios de cultivo que proporcionan los nutrientes para su crecimiento. En la producción de *Isochrysis galbana* con ciertas características deseadas, la composición del medio de cultivo es un factor fundamental. La relación entre los nutrientes utilizados y la composición de las células de microalgas es poco conocida (Becker, 1994). En general, los principales nutrientes (nitratos, fosfatos y silicatos) afectan la tasa de crecimiento y el nivel máximo de producción (Duerr, *et al.*, 1998), pero se sabe que este crecimiento también se ve limitado por la disponibilidad de hierro (Takeda 1998). Modificaciones en el medio de cultivo, como el nitrógeno, fósforo y hierro afectan la tasa de crecimiento, composición celular, perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica, así como su rendimiento final (Sánchez *et al.*, 2000). Sin embargo, la influencia de la fase de crecimiento e incorporación de nutrientes elementales en la composición bioquímica no ha sido claramente investigada (Lin *et al.*, 2007).

Diseño experimental

Se utilizó a la microalga *Isochrysis galbana* (var. T-iso, CCMP 1324) para cultivarla en régimen discontinuo y semicontinuo en minifotobiorreactores cilindro cónicos con 80 mL de volumen de cultivo. El medio de cultivo utilizado fue el denominado "ALGAL Industrial" desarrollado por Fábregas *et al.*, 1984; cuya composición y preparación se detalla en la tabla 1, tal medio de cultivo fue preparado en su totalidad con reactivos analíticos denominándole en lo sucesivo "Algal Analítico Industrial" (AAI) y preparado a una concentración de nitrógeno 4mM (NaNO_3). Posteriormente fueron preparadas soluciones 0, 0,1, 1,0, 10,0 y 100,0 mM (en el caso del Fe^{3+} se incluyó además la concentración 20,0 mM) de los siguientes elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} las cuales se añadieron por separado a la formulación de AAI; destacar que en el caso de los elementos Fe^{3+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} que son componentes de inicio en la formulación del AAI no fueron considerados en la preparación del mismo, para de ese modo poder probar las antes concentraciones de elementos.

Tabla 1.- Composición y preparación del "ALGAL ANALÍTICO INDUSTRIAL" (Fábregas et al., 1984)

"ALGAL ANALITICO INDUSTRIAL" 4 mM

Fábregas, J., Abalde, J., Herrero C., Cabezas, B., and Veiga, M. 1984. Growth of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture* 42: 207-215.

SOLUCIÓN 1

Macro/microelementos	Concentración mM	Cantidad mg.L ⁻¹
ZnCl ₂	1,0	27,258
MnCl ₂ ·2H ₂ O	1,0	39,582
NaMoO ₄ ·H ₂ O	1,0	48,388
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,1	4,7586
CuSO ₄	0,1	3,1722

EDTA 374,0

Nota: disolver en 200 mL de agua destilada

SOLUCIÓN 2

C ₆ H ₅ FeO ₇ ·H ₂ O	20	1051,88
--	----	---------

Note: disolver en 100 mL de agua destilada

SOLUCIÓN 3

Tiamina	7,0
Biotina	1,0
Cianocobalamina B ₁₂	0,6

Nota: disolver la tiamina en 98 mL de agua destilada acida (pH 4,5-5). Adicionar las otras vitaminas (Biotina y Cianocobalamina B₁₂)

SOLUCIÓN 4

NaNO ₃	2000	34,000
NaH ₂ PO ₄	100	2,400

Nota: disolver en 600 mL de agua destilada.

Las soluciones deberán ser autoclavadas y mezcladas en frío quedando las soluciones mezcladas en un volumen final de 1 Litro.

****** 10 mL de solución stock se adicionarán a 1L de agua de mar para quedar una concentración de NaNO₃ en 4 mM.

Los cultivos de *Isochrysis galbana* (var. T-iso) a diferentes concentraciones por elemento (tabla 2), se realizaron por triplicado (figura 1), sometidos a fotoperiodos circadianos de 12:12 h (luz:oscuridad respectivamente) con una intensidad luminosa de $152,3 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; proporcionándoles un flujo de aireación continua de 250 mL.min^{-1} , suplementado con inyecciones de CO_2 de 10 segundos cada 10 minutos durante el período de luz, con el objeto de mantener el pH de los cultivos entre 7,5 y 8 y proveer una fuente de carbono inorgánico.



Figura 1.- Sistema de cultivo discontinuo y semicontinuo de *Isochrysis galbana* var T-iso.

Se empleó una densidad inicial de $1,5 \times 10^6 \text{ células.mL}^{-1}$. Los cultivos se dejaron llegar hasta el final de la fase logarítmica. Se considero que alcanzó la fase estacionaria cuando la densidad celular en cultivo se mantuvo constante durante tres días consecutivos como mínimo, finalizando el cultivo discontinuo y evaluándose la biomasa generada.

Es en ese momento que se inicio el régimen semicontinuo de cultivo, el cual consistió en retirar o renovar diariamente a primera hora del ciclo de luz el 30% del cultivo (Fábregas *et al*; 1994, Fábregas *et al.*, 1995), substituyéndose por medio fresco; la tasa de renovación empleada fue en base a lo descrito por Otero 1994; Fábregas *et al*; 1995; 1998, Ferreira 2006, que resulta ser la mejor tasa productiva y bioquímicamente hablando. Se considero que alcanzó la fase de estabilización el cultivo semicontinuo cuando la densidad celular en cultivo se mantuvo constante durante tres días consecutivos como mínimo finalizando el cultivo semicontinuo; evaluándose la biomasa generada y cosechándose de 5 a 10 mL de biomasa microalgal por centrifugación, para el análisis correspondiente de proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, incorporación de metales; y filtración de biomasa microalgal, para determinación de peso seco, cenizas y materia orgánica por célula de *Isochrysis galbana* var. T-iso, en base a las técnicas descritas en la sección de Materiales y Métodos.

Tabla 2.- Designación de los elementos incorporados en diferentes concentraciones, en la formulación del "ALGAL ANALITICO INDUSTRIAL", para el cultivo de *Isochrysis galbana* var. T-iso (n=3 . condición)

ELEMENTOS								
[mM]	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Se^{2-}	Si^{4+}	Fe^{3+}	Zn^{2+}	Cu^{2+}	S^{2-}
0	Ca0	Mg0	Se0	Si0	Fe0	Zn0	Cu0	S0
0,1	Ca0,1	Mg0,1	Se0,1	Si0,1	Fe0,1	Zn0,1	Cu0,1	S0,1
1,0	Ca1,0	Mg1,0	Se1,0	Si1,0	Fe1,0	Zn1,0	Cu1,0	S1,0
10,0	Ca10,0	Mg10,0	Se10,0	Si10,0	Fe10,0	Zn10,0	Cu10,0	S10,0
100,0	Ca100,0	Mg100,0	Se100,0	Si100,0	Fe100,0	Zn100,0	Cu100,0	S100,0
20,0	---	---	---	---	Fe20,0	---	---	---

Resultados y discusión.

La densidad celular de los cultivos de *Isochrysis galbana* var. T-iso sometidos a diferentes concentraciones de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} , una vez que llegaron al final de la fase estacionaria de crecimiento, mostraron que la mayor y menor biomasa celular en estado de equilibrio para cada elemento, al día 16-18 de cultivo discontinuo fue la siguiente:

Mg^{2+} : 10,0mM ($111,75 \pm 9,94$) y 0mM ($102,13 \pm 10,58 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) (figura 2a)

Ca^{2+} : 100,0mM ($116,55 \pm 1,33$) y 0mM ($85,68 \pm 9,94 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) (figura 2b)

Si^{4+} : 100,0mM ($97,81 \pm 7,74$) y 0mM ($89,57 \pm 3,23 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) (figura 2c)

Se^{2-} : 1,0mM ($113,39 \pm 8,67$) y 10,0mM ($38,13 \pm 3,51 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) (Figura 2d)

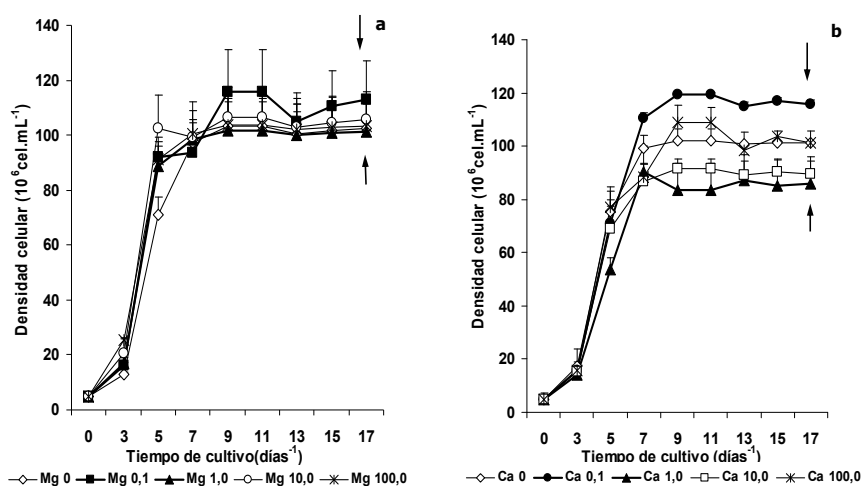


Figura 2.- Curvas de crecimiento para *Isochrysis galbana* var T-iso a diferentes concentraciones de: (a) Mg^{2+} , (b) Ca^{2+} . Cultivo discontinuo.

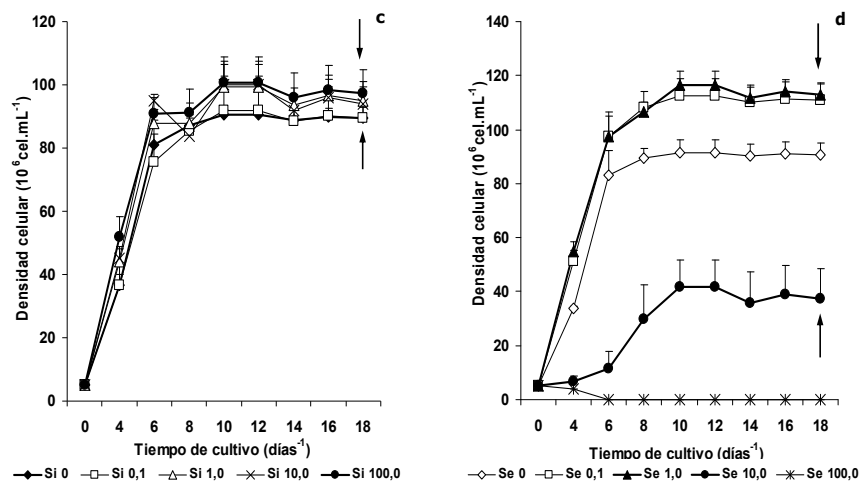


Figura 2.- Curvas de crecimiento para *Isochrysis galbana* var. T-iso a diferentes concentraciones de: (c) Si^{4+} , (d) Se^{2-} . Cultivo discontinuo.

Fe^{3+} : 20,0mM ($90,89 \pm 6,18$) y 0mM ($57,87 \pm 1,22 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) (figura 3a)

S^{2-} : 0,1mM ($83,61 \pm 8,85$) y 100mM ($58,26 \pm 5,26 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) (figura 3b)

Zn^{2+} : 1,0mM ($65,73 \pm 3,65$) y 100mM ($41,05 \pm 4,13 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) (figura 3c)

Cu^{2+} : 1,0mM ($83,63 \pm 5,57$) y 0mM ($71,14 \pm 4,22 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) (figura 3d)

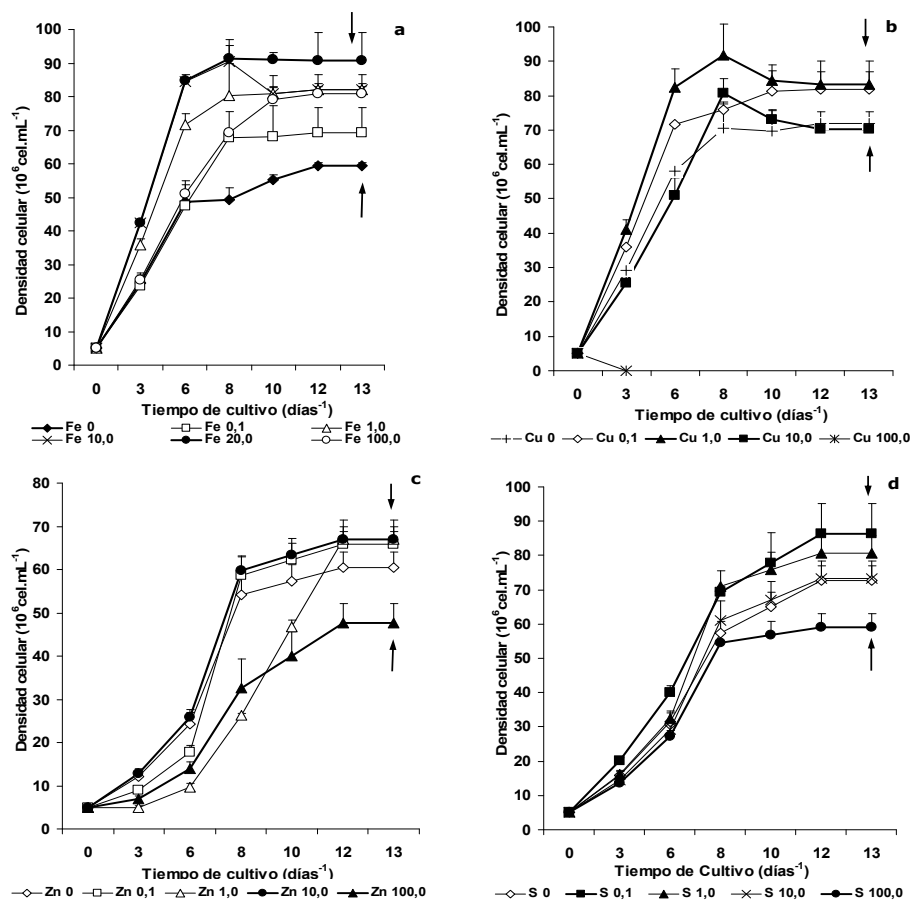


Figura 3.- Densidad celular *Isochrysis galbana* var. T-iso a diferentes concentraciones (a) Fe^{3+} , (b) S^{2-} , (c) Zn^{2+} , (d) Cu^{2+} . Cultivo discontinuo.

Existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo mencionadas ($p<0,05$) (figura 4a,b,c,d y figura 5a,b,c,d). Destacar que en el caso del Cu^{2+} y Se^{2-} la concentración 100 mM fue letal. Los resultados medios de concentración celular para *Isochrysis galbana* var. T-iso con respecto a todos los elementos mostraron marcadas diferencias, tales resultados son superiores e incluso duplican a los reportados por Otero, 1994, con la misma concentración 4mg át. N/L para *Isochrysis galbana* Parke. Por otra parte Ferreira, 2006 en *Isochrysis galbana* var. T-iso en su estudio con fuente de CO_2 y diferentes intensidades de luz, obtuvo solo al final del cultivo discontinuo densidades de 50 y $60 \times 10^6 \text{ células.mL}^{-1}$ respectivamente. Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999, 2002 empleando diferentes medios de cultivo para la misma especie de haptofita obtuvo solo concentraciones de $5 \times 10^6 \text{ células.mL}^{-1}$ con diferentes concentraciones en sus medios de cultivo de Cu^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} . Por lo que respecta a la concentración de los elementos Odum, 1971 menciona que un factor limitante en el crecimiento microalgal es aquel recurso primordial que esta presente en cantidades que se aproximan estrechamente al mínimo crítico requerido por la célula y si el nivel del factor limitante aumenta, la población microalgal crecerá a una velocidad mucho mayor hasta que el nivel del recurso limite la tasa de crecimiento o produzca toxicidad (Bontje *et al.*, 2009). La mayoría de autores concluyen que la concentración de metales o elementos que afectan el crecimiento microalgal en gran medida es variable y depende de las especies utilizadas, la densidad celular, la composición del medio o las condiciones físicas del cultivo (Reed and Gadd 1990; Genter, 1996, Moreno-Garrido *et al.*, 2000; Stauber and Davies, 2000; Franklin *et al.*, 2002, Debelius *et al.*, 2009).

Se obtuvieron tasas máximas de crecimiento para el Mg^{2+} [0,1mM] de 2,51 div.día⁻¹, Ca^{2+} [100,0] de 2,29 div.día⁻¹, Si^{4+} [0,0] de 1,14 div.día⁻¹, Se^{2-} [10,0] de 1,39 div.día⁻¹ (tablas 3-6), en tanto que para el Fe^{3+} [10,0] de 1,52 div.día⁻¹, S^{2-} [1,0] de 1,13 div.día⁻¹, Zn^{2+} [1,0] de 1,72 div.día⁻¹ y Cu^{2+} [1,0] de 1,49 div.día⁻¹ (tablas 7-10)

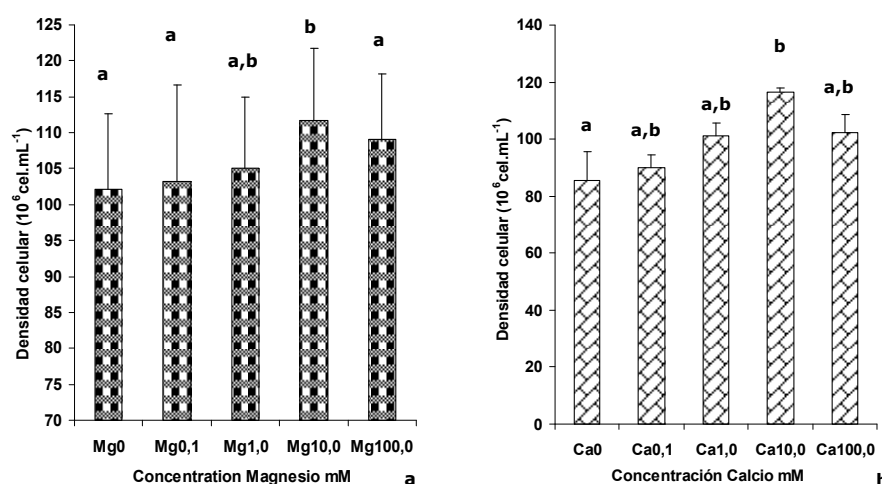


Figura 4.—Máxima densidad celular en cultivo discontinuo para *Isochrysis galbana* var. T-iso con diferente concentración de: **(a)** Mg^{2+} , **(b)** Ca^{2+} . Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

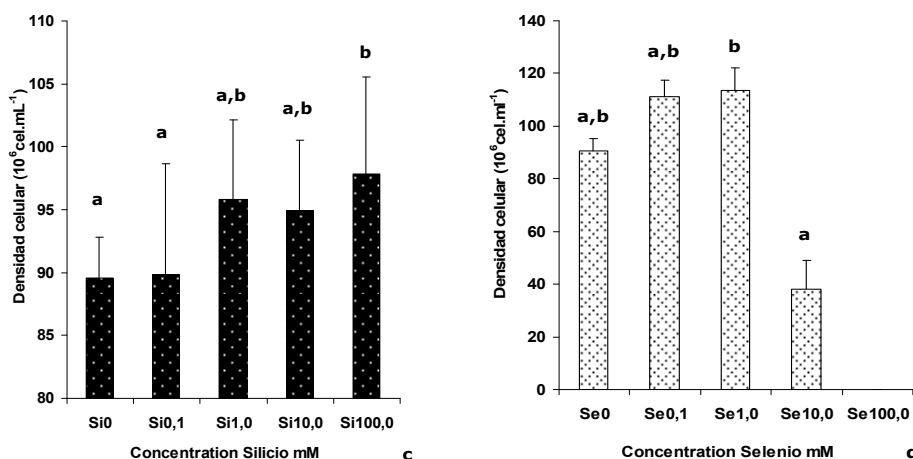


Figura 4.—Máxima densidad celular en cultivo discontinuo para *Isochrysis galbana* var. T-iso con diferente concentración de: (c) Si^{4+} , (d) Se^{2-} . Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

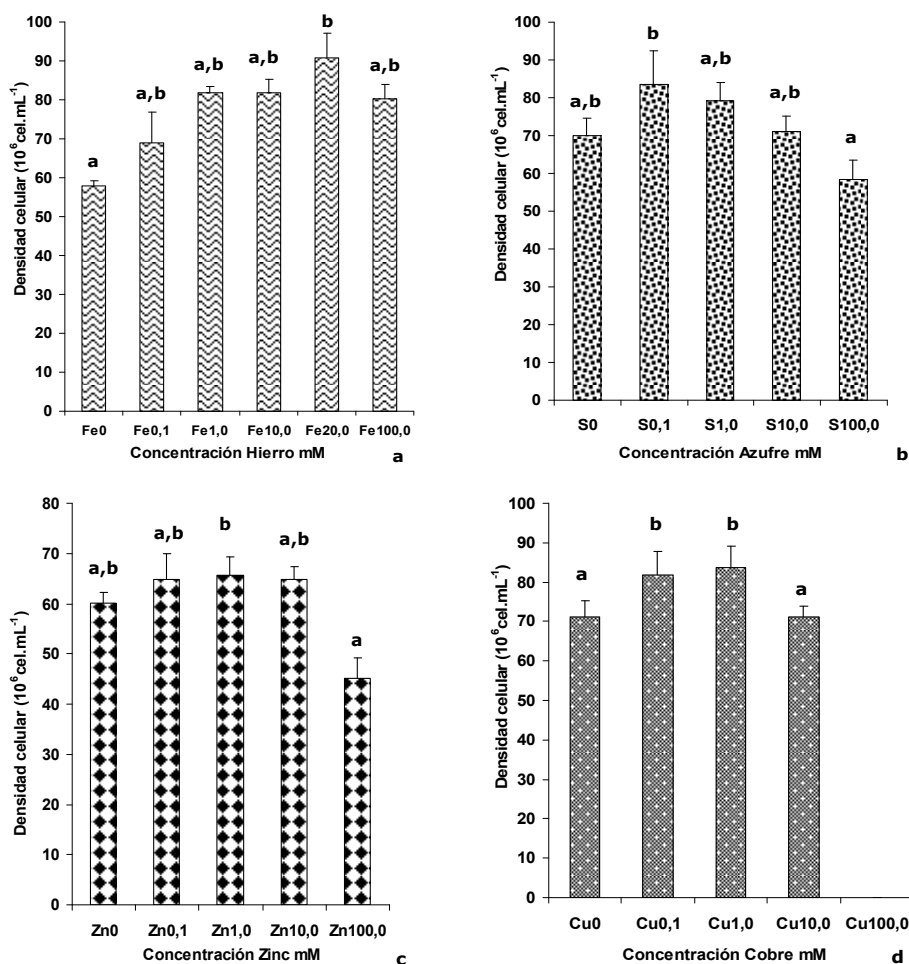


Figura 5.—Máxima densidad celular en cultivo discontinuo para *Isochrysis galbana* var. T-iso con diferente concentración de: (a) Fe^{3+} , (b) S^{2-} , (c) Zn^{2+} , (d) Cu^{2+} . Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

La generación de densidad celular en base a la concentración de los elementos ensayados, en cultivo discontinuo mostró las siguientes correlaciones r^2 (tabla 11):

Ca^{2+} ($r^2=0,75$), Se^{2-} ($r^2=0,95$), Fe^{3+} ($r^2=0,93$), Cu^{2+} ($r^2=0,99$), Zn^{2+} ($r^2=0,91$), S^{2-} ($r^2=0,94$), las cuales se ajustaron a un tipo de tendencia polinomial, en tanto que el Mg^{2+} ($r^2=0,77$) y el Si^{4+} ($r^2=0,92$) se ajustaron a una tendencia lineal. La tendencia polinomial demuestra que existe una concentración que optimiza la generación de biomasa celular, favoreciendo distintos procesos de la célula tanto fisiológicos como fotosintéticos; y que en concentraciones mayores al óptimo, dichos procesos disminuyen pudiendo causar incluso toxicidad como ocurrió con el Cu^{2+} y el Se^{2-} que llegaron a ser letales a una concentración 100 mM. Por lo que respecta a los elementos que mostraron una tendencia lineal, la concentración óptima no se observó pudiendo asumir que las células pueden incorporar más del elemento sin ser letal pero fisiológicamente no cumplir su objetivo. Darley, 1987, menciona que es debido tal fenómeno a que en los diferentes medios de cultivo la presencia del ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) ayuda ya sea a incrementar la disponibilidad de los elementos presentes o disminuir los niveles tóxicos de los iones libres.

Todos los metales pesados son tóxicos para las microalgas a altas concentraciones, aunque el grado de toxicidad difiere en los distintos metales pesados según pertenezcan al grupo de los esenciales (cobre, molibdeno, zinc, etc.) o al de los no esenciales (cadmio, plomo, mercurio etc). En ausencia de metales pesados esenciales, las microalgas disminuyen su eficiencia de crecimiento y se ven afectados uno o más procesos fisiológicos y/o bioquímicos, o es inhibida alguna parte de su ciclo vital o metabólico; al respecto Fabregas *et al.*, 1985a y Herrero *et al.*, 1991, sugieren que la producción de biomasa puede ser afectada por la concentración de los nutrientes en el medio de cultivo.

La densidad celular de estabilización en cultivo semicontinuo (CS) respecto al cultivo discontinuo (CD) para cada elemento presento diferencias con la tasa de renovación del 30%, de modo que elementos como el Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} decrecieron su concentración entre un 30 y 70% en CS, alcanzando el estado de equilibrio al día 31, existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las concentraciones de cultivo ($p<0,05$)., los valores de correlación r^2 se mantuvieron casi constantes con respecto al cultivo discontinuo en la mayoría de los elementos excepto el Ca^{2+} , Si^{4+} , Cu^{2+} (tabla 11); presentando el siguiente comportamiento de mayor a menor densidad celular:

Mg^{2+} : 10,0mM ($73,50 \pm 6,15$) y 0mM ($21,75 \pm 1,95 \times 10^6 \text{cel.mL}^{-1}$) (figura 6a)

Ca^{2+} : 10,0mM ($52,85 \pm 4,28$) y 0mM ($25,37 \pm 2,82 \times 10^6 \text{cel.mL}^{-1}$) (figura 6b)

Si^{4+} : 1,0mM ($85,25 \pm 6,56$) y 0mM ($27,20 \pm 2,50 \times 10^6 \text{cel.mL}^{-1}$) (figura 6c)

Se^{2-} : 1,0mM ($85,50 \pm 7,28$) y 0mM ($21,04 \pm 0,94 \times 10^6 \text{cel.mL}^{-1}$) (Figura 6d)

Mostrando una productividad celular que fluctuó entre $6,52$ y $22,05 \times 10^9 \text{cél.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ (Mg^{2+}), $7,61$ y $15,85 \times 10^9 \text{cél.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ (Ca^{2+}), $8,16$ y $25,57 \times 10^9 \text{cél.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ (Si^{4+}), $6,42$ y $25,65 \times 10^9 \text{cél.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ (Se^{2-}) (tabla 3-6). Estas productividades fueron superiores a las reportadas por Otero, 1994 con *Isochrysis galbana* Parke ($10,80 \times 10^9 \text{cél.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$) en similar concentración de nitrógeno y tasa de renovación de entre el 30-40%. En tanto que Laing and Jones, 1983, 1988 con *Isochrysis galbana* var. T-iso en sistemas de turbidostato de 40 y 80 L obtuvieron productividades de $12,95$ y $15-17 \times 10^9 \text{cél.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ valores por debajo a los descritos en el presente estudio.

Las recetas de medios de cultivo actualmente disponibles, no siempre son adecuadas para muchas especies, y la elección exacta para una especie en particular depende de ensayo y error. Se debe recordar que en el cultivo en general existen o no métodos equivocados; los medios de cultivo se han desarrollado probando varias adiciones, generalmente basadas en consideraciones teóricas. El perfeccionamiento de la composición de los medios, para el mantenimiento en laboratorio de cultivos microalgales, han sido objeto de investigación por varias décadas, dando lugar a muchas recetas de diferentes medios que se informan en la literatura y que se utilizan en diferentes laboratorios (Harrison *et al.*, 1980; Keller *et al.*, 1987; Fábregas *et al.*, 2000; Berges *et al.*, 2001; Barsanti and Gualtieri, 2006). Las formulaciones de medios de cultivo más empleados hoy en día en acuicultura son: Erdschreiber (Foyn 1934), f/2 (Guillard and Ryther, 1962), Walne 1970, algal (Fábregas *et al.*, 1984)

El magnesio es crucial en el funcionamiento del metabolismo celular, su ausencia modifica el metabolismo del nitrógeno alterándolo, además de limitar la acumulación temporal de carbohidratos y síntesis de proteínas. Probablemente, la mayor parte del Mg en la mayoría de las células está involucrado en la agregación de los ribosomas en unidades funcionales. El Mg funciona en las reacciones que implican la transferencia de "alta energía" de grupos fosfato y como componente de la clorofila (Healy, 1973).

Requerimientos de calcio para la máxima división y crecimiento celular se ha demostrado para las algas verdes, las cianobacterias, y diatomeas (Gerloff and Fishbeck, 1969; Kylin and Das, 1967). Si bien la función del Ca sigue siendo en gran parte desconocida, está implicado en la deposición calcárea y esqueletos de varias microalgas marinas ya que forma parte importante de la pared celular, además de estar relacionada con algunos procesos enzimáticos. En general, de los elementos requeridos en cantidades relativamente grandes al menos en algunas microalgas, el Ca parece ser el menos comprendido funcionalmente (Kaplan *et al.*, 1990).

La captación de Si depende de procesos energéticos. La absorción de silicio parece estar confinada a la parte del ciclo de división celular inmediatamente anterior a la separación de células, durante el cual la pared celular está presente lo que sugiere que el proceso de transporte está estrechamente relacionado con la deposición de la pared. El Si es un requisito específico para la síntesis de proteínas, ADN, RNA, clorofila, xantofilas, y lípidos, así como la fotosíntesis (O'Kelley, 1974, Kaplan *et al.*, 1990; Legrand *et al.*, 1991).

El selenio desempeña un papel que no está claro en la alimentación microalgal y toxicidad. Estimula la división y crecimiento celular en algunas microalgas marinas, diatomeas, así como algunos dinoflagelados de agua dulce y cianobacterias (McKeown and Mariñas 1986; Kaplan *et al.*, 1990; Frankerberger and Benson 1994; Li *et al.*, 2003).

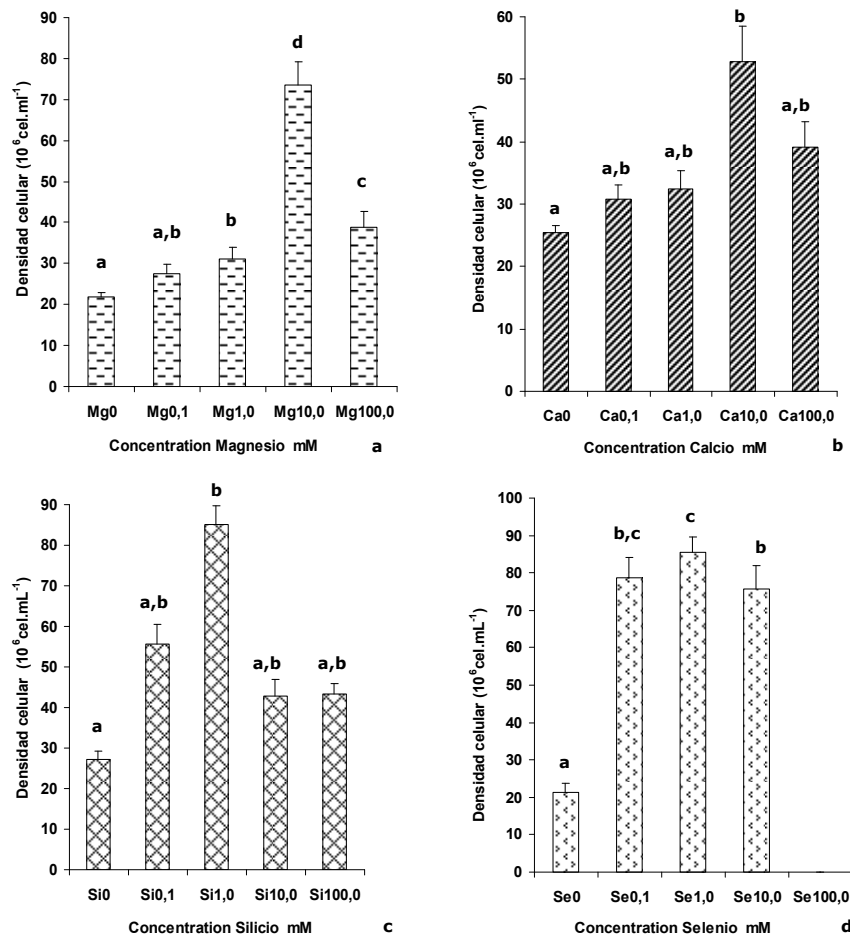


Figura 6.- Máxima densidad celular en cultivo semicontinuo para *Isochrysis galbana* var. T-iso con diferente concentración de: **(a)** Mg^{2+} , **(b)** Ca^{2+} , **(c)** Si^{4+} , **(d)** Se^{2-} . Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

En el caso del Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , la densidad celular de estabilización entre el día 30-32 de cultivo en semicontinuo y con respecto al cultivo discontinuo disminuyo, en el caso del Fe^{3+} el 90% en las concentraciones 0, 0,1 mM, S^{2-} 50% en 0mM, Zn^{2+} 95% en 100mM, obteniendo los siguientes valores de mayor a menor densidad celular donde existieron diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las concentraciones de cultivo ($p<0,05$):

Fe^{3+} : 20,0mM ($99,11 \pm 3,50$) y 0mM ($7,76 \pm 0,19 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$) (figura 7a).

S^{2-} : 1,0mM ($100,33 \pm 5,86$) y 0mM ($48,31 \pm 4,11 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$) (figura 7b).

Zn^{2+} : 1,0mM ($88,21 \pm 5,57$) y 100mM ($3,36 \pm 0,40 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$) (figura 7c).

Cu^{2+} : 1,0mM ($95,21 \pm 5,24$) y 0,mM ($79,87 \pm 5,96 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$) (figura 7d).

Los cultivos en régimen semicontinuo mostraron una productividad celular que fluctuó entre $2,33$ y $29,73 \times 10^9 \text{ cél.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ (Fe^{3+}), $14,49$ y $30,11 \times 10^9 \text{ cél.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ (S^{2-}), $23,96$ y $28,56 \times 10^9 \text{ cél.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ (Cu^{2+}), $1,80$ y $26,46 \times 10^9 \text{ cél.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ (Zn^{2+}) (tabla 7-10). Otero, 1994 con *Isochrysis galbana* Parke y tasa de renovación igual del 30%, y concentración 4 mg át.N/L obtuvo productividades inferiores a los óptimos descritos en este estudio. Laing, 1985 con *Isochrysis galbana* var. T-iso solo obtuvo productividades de $6,50 \times 10^9 \text{ cél.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$, por

otra parte Herrero *et al.*, 1991 obtuvo con una concentración 2 mg át.N/L una productividad de $1,5 \times 10^9 \text{cél.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$. Ferreira, 2006 en su estudio sobre la intensidad luminosa en *Isochrysis galbana* var. T-iso obtuvo solo una máxima productividad a una tasa de renovación del 30% de $18,17 \times 10^9 \text{cél.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$. Axler *et al.*, 1980, en experimentos de enriquecimiento demostraron que la productividad se intensifica al añadir al medio de cultivo Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mo^{6+} , Co^{3+} y Zn^{2+} aunque no menciona que concentraciones. La nutrición con elementos es un tema complicado debido a que la concentración absoluta suele ser menos importante que la disponibilidad del elemento, lo cual puede ser afectado por cierto número de variables del cultivo. Es claro además, que el medio mineral facilita la producción de metabolitos secundarios, especialmente productos extracelulares (Sastre *et al.*, 2007).

El azufre es necesario en la división celular especialmente en las diatomeas; tanto en la división nuclear como citoplásmica, en la mayoría de las microalgas se incorpora en las proteínas, en lípidos, en forma de sulfolípidos y polisacáridos esterificados. Metabólicamente, formas activas de azufre como S-adenosyl metionina y adenosin-3'-fosfato-5'-fosfosulfato pueden encontrarse en las algas (O'Kelley, 1974).

El hierro es necesario en la oxidación biológica en microalgas. Tal elemento más el manganeso son importantes en la productividad y tasas fotosintética y respiratoria. Dropp 1961 ha señalado la importancia del potencial redox del medio marino en relación con el hierro, el cual tiene efecto importante sobre la absorción de hierro por diatomeas y microalgas marinas. El nivel de hierro en el medio de cultivo afecta la producción de clorofila, así como el crecimiento. Es parte esencial de algunas enzimas.

La mayoría de las microalgas requieren del zinc, deficiencia de este elemento produce bajas cantidades de RNA, pero cuando no existe deficiencia de él, existe un alto contenido de aminoácidos y DNA en las células, en ausencia de zinc desaparecen los ribosomas citoplasmáticos, por lo que juega un papel importante en la preservación de la estructura de los componentes ribosomales (Schuster and Broda, 1970).

Todas las microalgas requieren al cobre como micronutriente. Una de las bases metabólicas de este requisito es su papel en la fotosíntesis para la formación de plastocianina. Existe además como parte de las proteínas en el aparato fotosintético. Elevada concentración de cobre en suma con la intensidad de luz y otros iones en exceso como el hierro, inhiben la fotosíntesis, división y concentración celular. El pH es un factor de toxicidad de este elemento por encima de 8 y por debajo de 5 (O'Kelley, 1974).

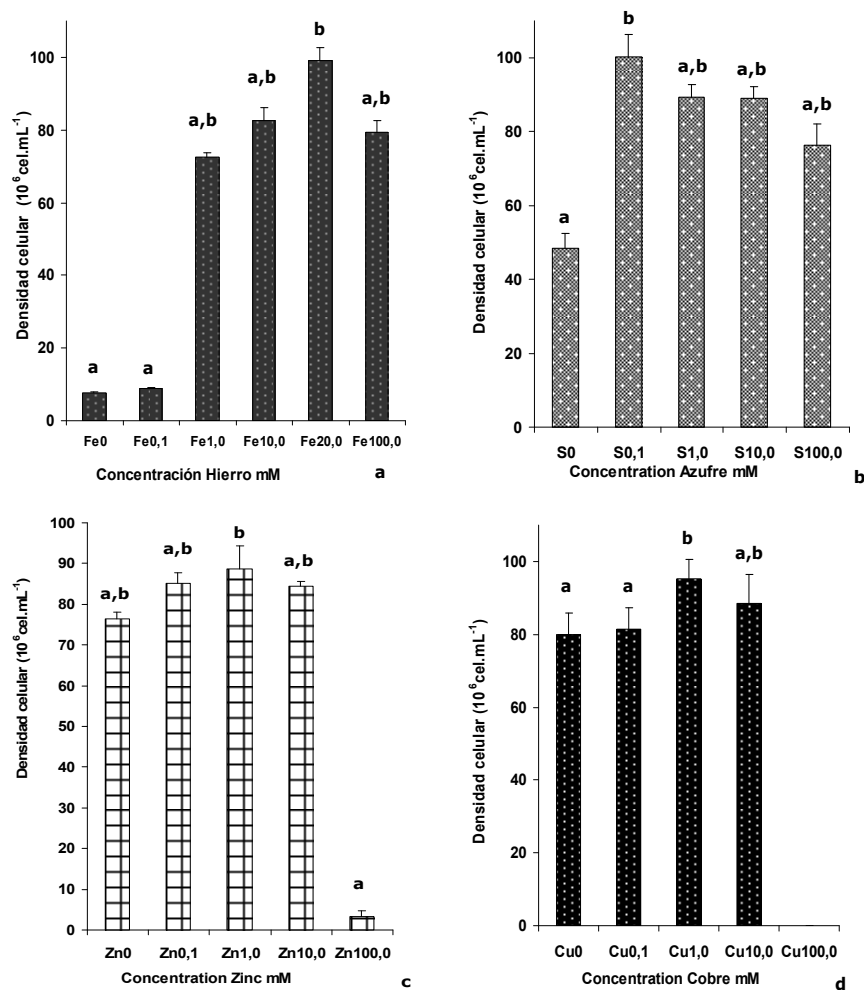


Figura 7.- Máxima densidad celular en cultivo semicontinuo para *Isochrysis galbana* var T-iso con diferente concentración de: **(a)** Fe³⁺, **(b)** S²⁻, **(c)** Zn²⁺, **(d)** Cu²⁺. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

Es en base a lo anteriormente expuesto que los macro y micro minerales a menudo actúan como activadores e inhibidores enzimáticos, no es de extrañar en base a nuestros resultados que su efecto es más marcado en la tasa de crecimiento en lugar de rendimiento total dada la concentración de estos. La distinción entre la concentración que afecta el rendimiento y la tasa de crecimiento es importante. Diversos autores han demostrado una relación inversa entre la inhibición del crecimiento por una sustancia tóxica y el suministro de nutrientes (Braek *et al.*, 1980). Este efecto puede ser en parte indirecto, debido a los nutrientes inducida por los cambios fisiológicos en la célula. En el crecimiento exponencial de las células en general, ocupan los metales a un ritmo mayor que las células en fase estacionaria de crecimiento. Cuando los efectos directos se han observado a menudo es difícil determinar si las interacciones son verdaderamente fisiológicas o alteraciones químicas del metal (o nutrientes) en disponibilidad en el medio.

Se cuantifico la cantidad de nitrógeno residual, al final de la etapa de estabilización de los cultivos en semicontinuo, donde para el caso del Mg²⁺ fluctuó entre 0 y 1,97mM; Ca²⁺ 0,28 y 2,15mM; Si⁴⁺ 0 y 1,19mM; Se²⁻ 0 y 1,89mM (tabla 3-6); en tanto que para el Fe³⁺ oscilo entre 0 y 3,27mM; S²⁻ 0,03 y 0,07mM; Zn²⁺ 0,01 y 3,13mM y Cu²⁺ 0,04 y 0,14mM (tabla 7-10). La fluctuación del nitrógeno (N) residual entre las concentraciones de los

elementos, correspondió con la densidad celular generada (*tablas 3-10*), es decir a mayor densidad celular menor cantidad de nitrógeno residual o mejor dicho conversión de nitrato en nitrógeno intracelular (Otero, 1994, Otero *et al.*, 1998) esto indica que existió limitación por nitrógeno en la concentración óptima de los elementos en el crecimiento microalgal; y que concentraciones del elemento por encima del óptimo ejercen un subaprovechamiento o punto de saturación del nitrógeno; debido al descenso de densidad celular a causa de la concentración del elemento ensayado, hasta comportarse de manera letal como fue el caso del Se^{2-} [100,0mM], Cu^{2+} [100,0mM] y subletal Zn^{2+} [100,0mM], lo que nos indicaría en este punto una función complementaria toxica entre la concentración de nitrógeno residual y la concentración del elemento no óptima.

Situación que coincide con la mayor cuota celular de nitrógeno Q_N y carbono Q_C (pg.cel^{-1}), para la [mM] óptima de todos los elementos ensayados, existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las concentraciones de cultivo ($p<0,05$): Mg^{2+} [10,0](0,87-9,47), Ca^{2+} [10,0](0,70-7,41), Si^{4+} [1,0](1,06-11,06), Se^{2-} [1,0](0,62-6,23), (*tablas 3-6*); Fe^{3+} [20,0](0,83-7,44), S^{2-} [0,1](0,79-6,98), Zn^{2+} [1,0](0,79-7,51), Cu^{2+} [1,0](0,82-7,32), (*tablas 7-10*). Los valores máximos de Q_N y Q_C reportados en este estudio son inferiores a los reportados por Otero, 1994 con *Isochrysis galbana* Parke a una tasa de renovación del 30% en cultivos en ciclostato (1,71 y 12,01 pg.cel^{-1} respectivamente). Mientras que Ferreira, 2006 en *Isochrysis galbana* var. T-iso con tasa de renovación del 30% y 4 mg át.N/L obtuvo un Q_N y Q_C de 0,71 y 6,42 pg.cel^{-1} comparativamente, valores por debajo de los aquí reportados excepto para el Ca^{2+} y el Se^{2-} (*tablas 4 y 6*).

Se observó que la relación C:N dependiendo del elemento no siguió el mismo patrón de evolución (*figuras 8 a-h*) ya que el Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , S^{2-} (*tablas 3,4,5,8*), incrementaron los valores de tal relación hasta la concentración óptima del elemento para después descender, en lo que respecta al Fe^{3+} los valores de C:N mostraron valores muy similares (*tablas 7*), en tanto que en el Se^{2-} y Cu^{2+} tal relación descende con la concentración del elemento (*tablas 6 y 10*), esto debido tal vez a su carácter toxico a concentraciones elevadas; para ambas cuotas celulares existieron diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las concentraciones de cultivo ($p<0,05$). Los valores máximos de C:N coinciden con los óptimos de concentración elemental reflejo de la densidad celular generada; donde el nitrógeno residual con tendencia a cero indicaría una limitación por este (Laws and Bannister, 1980). Es evidente que el incremento en la evolución de Q_N indica que fue el nitrógeno (Eppeley and Renger, 1974; Laws and Wong, 1978; Chalup and Laws, 1990) y no la concentración del elemento en caso de no ser toxica, el que funciona como un limitante del crecimiento celular.

La relación C:N posterior al optimo se estabiliza respecto al elemento entre 9,27 y 7 (*figuras 8a-h*). Los anteriores valores son mayores a los reportados por Otero, 1994 con *Isochrysis galbana* Parke y diferentes tasas renovación en cultivos en ciclostato donde encuentra una estabilización entre 7,28 y 7,04. Sin embargo Ferreira, 2006 con *Isochrysis galbana* var. T-iso con diferentes intensidades de luz y tasas de renovación, halla una estabilización entre 8,3 y 7. Los valores de estabilización descritos en el presente estudio son mayores a los reportados por Osborne and Geider, 1986, con respecto a la relación Redfield

(C:N 6,6) cuando no existe limitación por nutrientes (Goldman *et al.*, 1979; Goldman and Peavey, 1979, Goldman 1986) indicando la proximidad de la máxima tasa de crecimiento (McCarthy, 1980). Otero, 1994 demuestra en cultivos en ciclostato que la relación C:N en *Isochrysis galbana* Parke varía fuertemente con la tasa de crecimiento, y tiende a estabilizarse alrededor de 7,1. Los máximos valores de C:N producto de la concentración óptima de los elementos ensayados en el presente estudio, fueron incluso mayores que los descritos por Parsons *et al.*, 1961, en cultivos discontinuos con valores de C:N de 7,5; y muy cercanos a los descritos por Sukenik and Wahnnon, 1991 los cuales reportan con *Isochrysis galbana* var. T-iso una relación C:N de 9,4 en cultivos en turbidostato sin limitación de nutrientes. Los valores de estabilización de C:N dependerán de las condiciones de saturación por nitrógeno y la concentración del elemento (como es el caso de este estudio) en cultivos en semicontinuo, con regimenes de iluminación circadiana (12:12h luz:oscuridad) (Otero *et al.*, 1998).

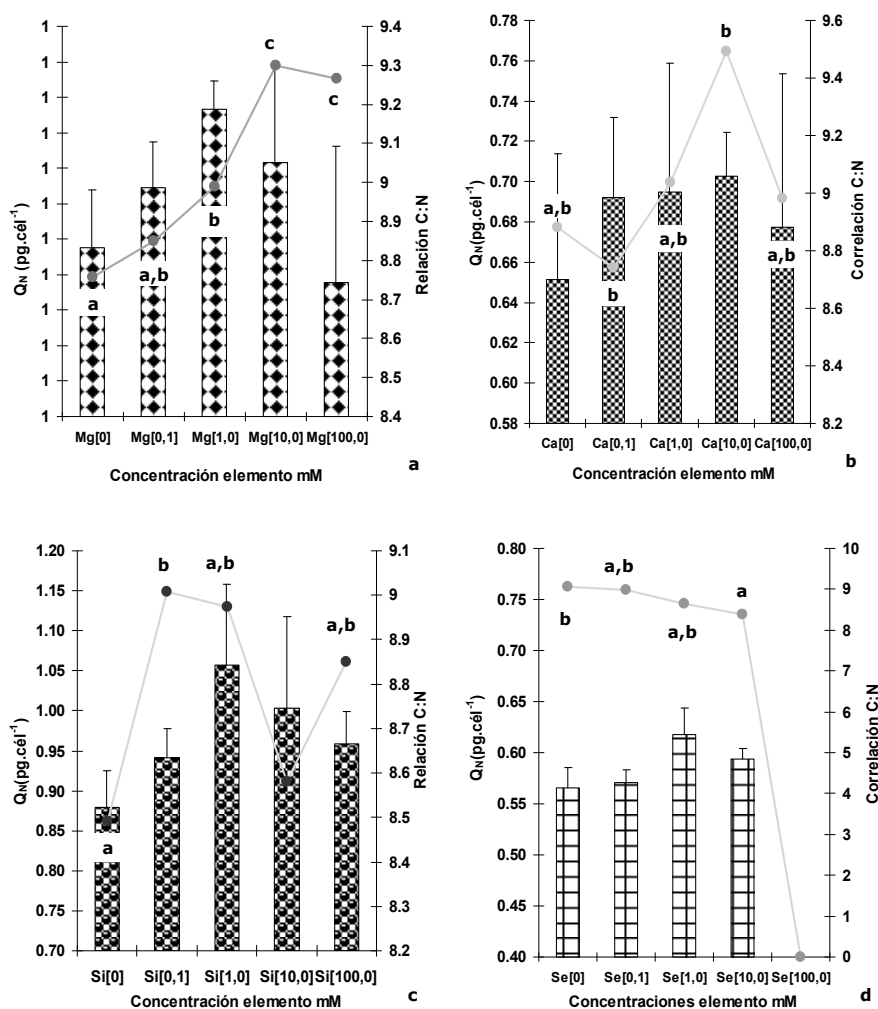


Figura 8.- Evolución de la cuota celular de nitrógeno Q_N y de la relación C:N respecto la concentración de elementos *I. galbana* var. T-iso: **(a)** Mg^{2+} , **(b)** Ca^{2+} , **(c)** Si^{4+} , **(d)** Se^{2-} . Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

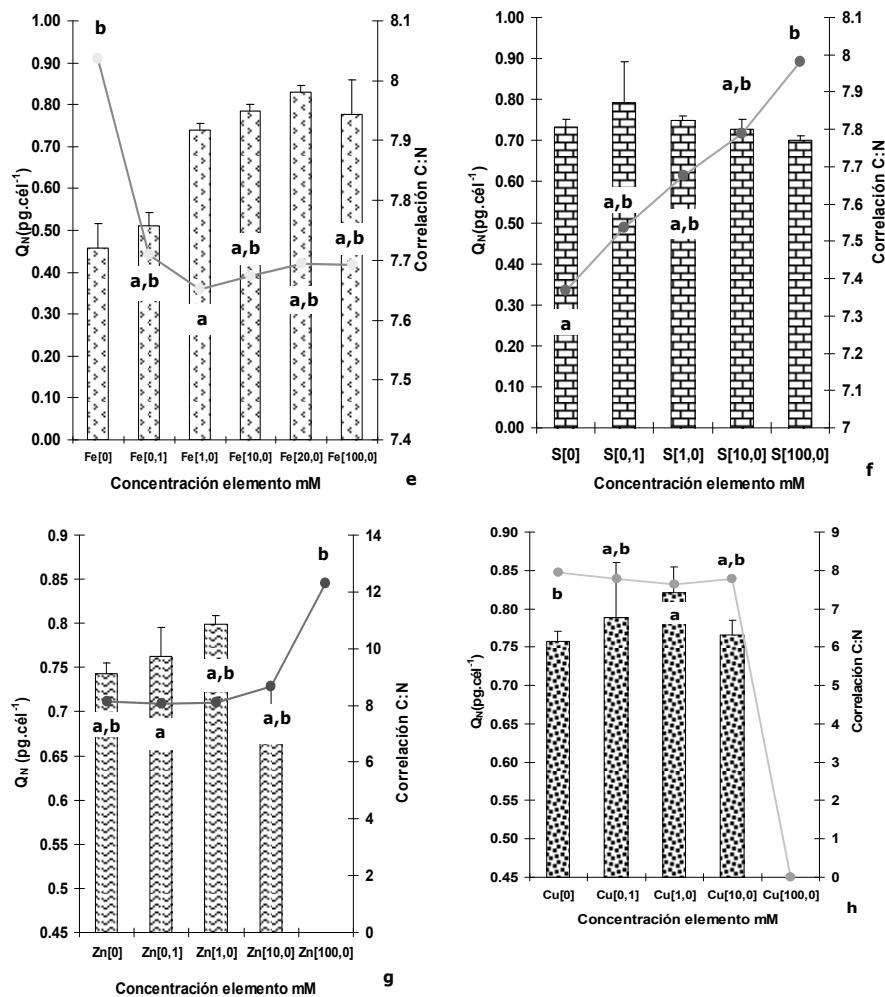


Figura 8.- Evolución de la cuota celular de nitrógeno Q_N y de la relación C:N respecto la concentración de elementos *I. galbana* var. T-iso: **(e)** Fe^{3+} , **(f)** S^{2-} , **(g)** Zn^{2+} , **(h)** Cu^{2+} . Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

La composición bioquímica celular (proteínas, carbohidratos y lípidos) de *Isochrysis galbana* var. T-iso, vario ampliamente con respecto al elemento y concentración [mM], existiendo en la evolución de los tres combustibles bioquímicos, diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo ($p<0,05$) (Tabla 3-10).

Elementos como el Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , S^{2-} (con coeficientes de correlación r^2 de 0,96, 0,82, 0,40, 0,53 respectivamente), mostraron un mayor contenido proteico celular derivado de Q_N (tablas 3-10), con respecto a los carbohidratos ($r^2= 0,46, 0,56, 0,71, 0,92$ respectivamente) y estos con respecto a los lípidos ($r^2= 0,98, 0,74, 0,61, 0,91$ respectivamente), tabla 11, con diferentes comportamientos hiperbólicos positivos y negativos (figuras 9a-h). En tanto que el Se^{2-} y el Cu^{2+} revelaron un mayor contenido de carbohidratos ($r^2= 0,68, 0,99$ correspondientemente), seguido de los lípidos ($r^2= 0,51, 0,99$ comparativamente) y de estos el contenido proteico ($r^2= 0,98, 0,99$). Finalmente el Fe^{3+} y el Zn^{2+} presentaron un mayor contenido de lípidos ($r^2= 0,46, 0,85$), continuado por los carbohidratos ($r^2= 0,78, 0,82$), seguido de las proteínas ($r^2= 0,66, 0,95$) (figuras 9a-h).

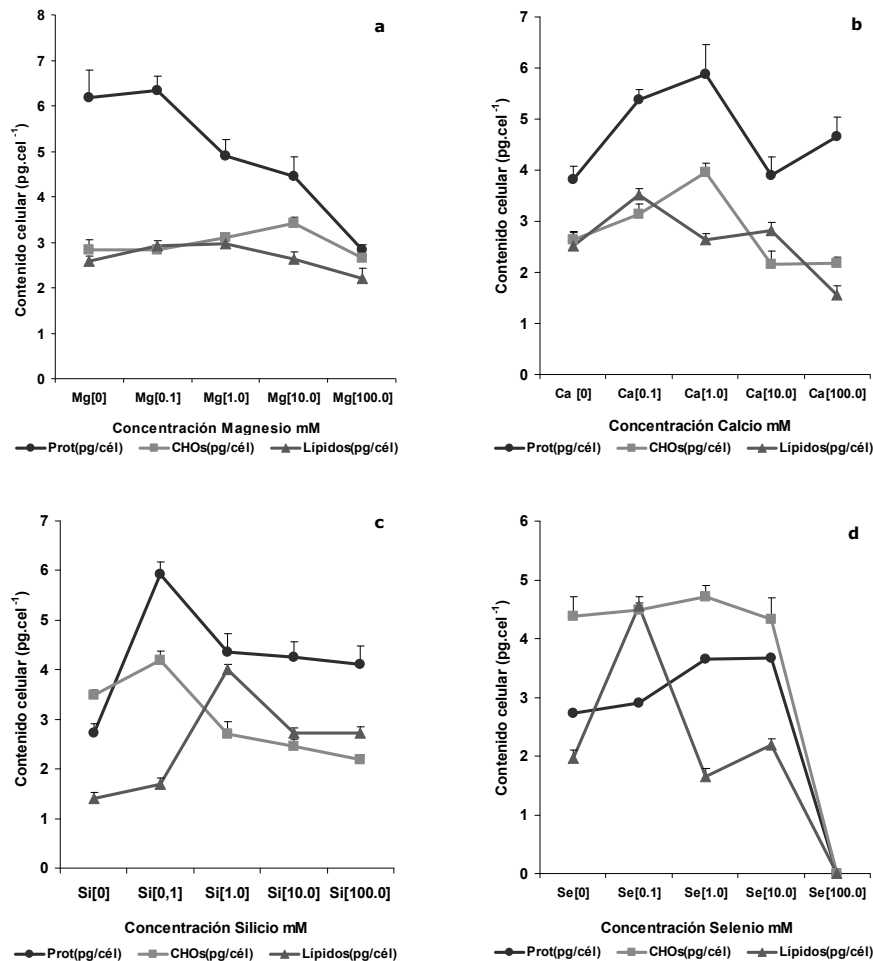


Figura 9.- Contenido celular (pg.cel^{-1}) de proteínas, carbohidratos y lípidos, respecto la concentración de elementos en *Isochrysis galbana* var. T-iso: **(a)** Mg^{2+} , **(b)** Ca^{2+} , **(c)** Si^{4+} , **(d)** Se^{2-} . Media \pm SD ($n=3$).

El contenido proteico celular máximo, dado de la concentración óptima de los elementos experimentados en la generación de densidad celular solo coincidió con el Se^{2-} , Si^{4+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} , aunque en la mayoría de los casos mostraron valores entre 3,66 y 5,93 pg.cel^{-1} , valores que están dentro del rango reportado por Ferreira, 2006; Ferreira *et al.*, 2008 en estudios realizados con presencia, ausencia de CO_2 y diferentes tasas de iluminación en *Isochrysis galbana* var. T-iso. Brown, 1991 utilizando la misma especie en cultivo discontinuo reportó un valor proteico de 6,8 pg.cel^{-1} . En tanto que Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002 en cultivos discontinuos logró un contenido proteico con diferentes medios de cultivo entre 7,33 y 7,64 pg.cel^{-1} , valores que superan a los descritos en este estudio. Tales valores son debidos a la fase del cultivo en la cual fue realizada la determinación del contenido proteico, al respecto Whyte, 1987, menciona que el contenido de proteína decrecerá en la medida en que se aproxime el agotamiento de los nutrientes, tal concepto coincide con lo reportado en este estudio respecto a los valores de nitrógeno residual obtenidos motivo de la tasa de renovación al 30%. Utting, 1985 menciona que cuando se aproxima un cultivo al agotamiento o deficiencia en nitrógeno se incrementa el contenido de carbohidratos, disminuyendo el de proteína, mientras que los lípidos se comportaran de forma diferente según la especie estudiada. Piorreck and Phol, 1984; Kaixian

and Borowitzka, 1992; Fernández Sevilla, 1995, mencionan que tiempos de residencia cortos de nutrientes y en suma su importancia fisiológica es que promoverán la formación de proteínas, combustible rápidamente empleado en el crecimiento y división celular por lo que es de esperarse los valores de este estudio en cultivo semicontinuo, en adición a la concentración del elemento que dependiendo de su concentración poseerá una amplia implicación en la síntesis de proteínas como mencionan varios autores (O'Kelley, 1974; McCarthy, 1980; Kaplan *et al.*, 1990).

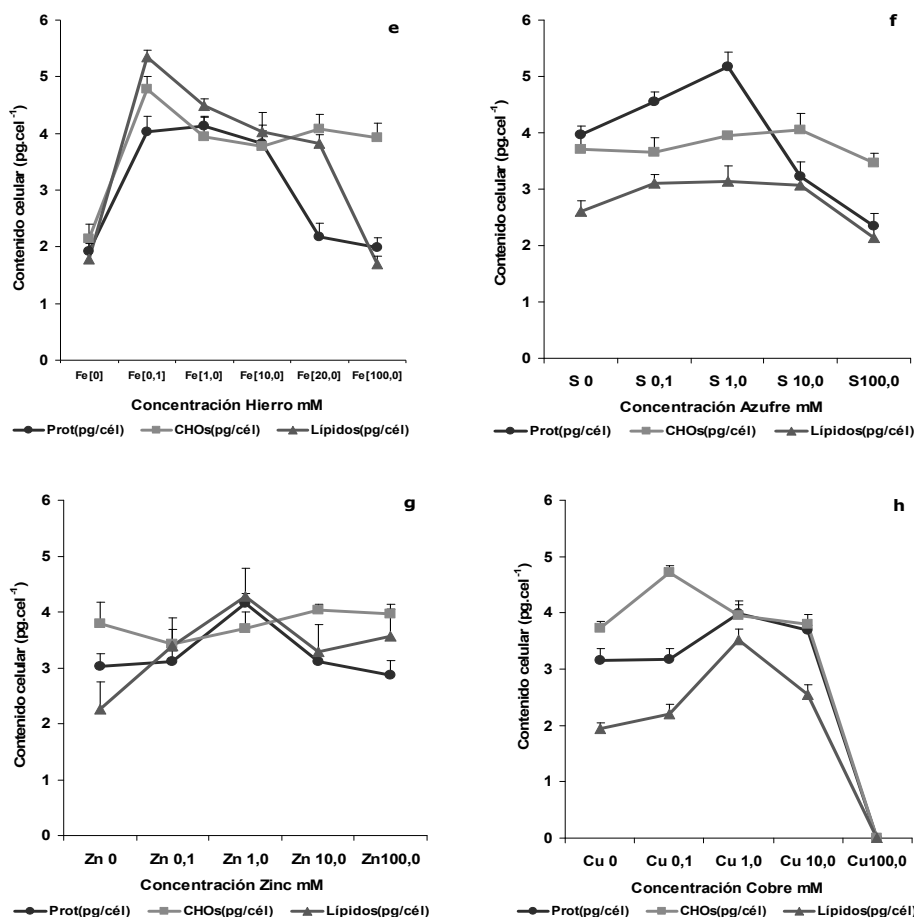


Figura 9.- Contenido celular (pg.cel^{-1}) de proteínas, carbohidratos y lípidos, respecto la concentración de elementos en *Isochrysis galbana* var. T-iso: **(e)** Fe^{3+} , **(f)** S^{2-} , **(g)** Zn^{2+} , **(h)** Cu^{2+} . Media \pm SD ($n=3$).

El segundo combustible bioquímico, mayormente almacenado en la célula con Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , S^{2-} , fueron los carbohidratos, los cuales se acumularon preferentemente conforme existió un óptimo de concentración del elemento (*figura 9 a,b,c,f*) y que coincidió con un agotamiento o disminución del nitrógeno residual (*tabla 3-10*) en el medio de cultivo. Se obtuvo un contenido de carbohidratos máximo respecto a cada elemento que fluctuó entre 2,17 y 4,19 pg.cel^{-1} (*tabla 3-10*), valores cercanos a los reportados por Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002 con diferentes medios de cultivo con 3,8 y 4,0 pg.cel^{-1} , en tanto que Fernández Reiríz *et al.*, 1989 halla valores muy bajos con 1,80 pg.cel^{-1} . En continuación el contenido de los lípidos demostró respecto al elemento valores en el rango de 1,69 y 4,28 pg.cel^{-1} (*figura 9 a-h*) valores que se encuentran por debajo de los reportados por Fernández Reiríz *et*

al., 1989 con $5,90 \text{ pg.cel}^{-1}$ y muy cercanos a los $4,81 \text{ pg.cel}^{-1}$ hallado por Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002.

La dinámica que sigue la evolución del perfil bioquímico por *Isochrysis galbana* var. T-iso con respecto a la concentración óptima de los elementos aquí estudiados es similar a lo reportado por Brown *et al.*, 1993a hallando que en la fase estacionaria de cultivos en semicontinuo el contenido celular de carbohidratos y lípidos es significativamente mayor que el de proteínas; por lo que desde el punto de vista energético son utilizados como fuentes de almacenamiento, bajo limitación de nitrógeno (Brown *et al.*, 1996); tal tendencia a sido reportada para carbohidratos en diatomeas (Myklestad, 1974). Estos resultados sugieren que cambios en la composición bioquímica celular fueron influenciados por la concentración de los elementos en el medio de cultivo "Algal". Los carbohidratos se han demostrado que son la reserva energética intermedia en algunas microalgas, debido a que son necesarios cuando la fuente de nitrógeno se ve limitada en la síntesis de lípidos. En el presente estudio cuando el contenido de proteína decreció, lípidos y carbohidratos se incrementaron hasta un óptimo en virtud de la concentración de los elementos existiendo una clara relación entre la concentración elemental y el estado fisiológico de las células en el cultivo. Estos cambios en los componentes han sido discutidos por otros autores, los cuales mencionan que el contenido de proteínas siempre es mayor en la fase exponencial (Renaud, *et al.*, 1999). Por el contrario, los carbohidratos y lípidos tienden a acumularse en la fase estacionaria de los diferentes tipos de cultivo (Helm and Laing, 1987; Brown *et al.*, 1993a; Zhu *et al.*, 1997).

Ferreira, 2006 menciona que las microalgas del género *Isochrysis* acumulan los dos tipos de productos de reserva, pero la predominancia de carbohidratos o lípidos parece depender de las condiciones de cultivo mas que de la especie, lo que nos da una idea de la versatilidad de la actividad metabólica celular vía la concentración de ciertos elementos, los cuales poseen acusada implicación en la síntesis de proteínas, lípidos y carbohidratos, además de otros metabolitos intermedios (O'Kelley, 1974; McCarthy, 1980; Kaplan *et al.*, 1990). Fernández Reiríz *et al.*, 1989, menciona que en cultivos no continuos tanto lípidos como carbohidratos se incrementan con la edad del cultivo, siendo más acusado el aumento de los carbohidratos y posibles responsables de la variación del peso orgánico en cultivos en fase estacionaria.

Cuando el contenido de proteína se considera como porcentaje de la fracción orgánica, el valor de proteína según la concentración del elemento fluctuó entre el 35 y 55% como es el caso del Mg^{2+} , Ca^{2+} y Si^{4+} ; en tanto que para el S^{2-} osciló entre el 29 y 42% y en el caso del Se^{2-} , Fe^{3+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} fluctuó entre el 21 y 37%, *figuras 10 a-h*, en todos los casos con diferentes comportamientos hiperbólicos. Por lo que respecta al porcentaje de lípidos, elementos como el Mg^{2+} , Se^{2-} , Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} y Cu^{2+} presentaron un rango de comportamiento del 21 al 38%; mientras que el Ca^{2+} y el Si^{4+} mostró un intervalo del 14 al 36% de lípidos así mismo con diferentes conductas hiperbólicas. En el caso de los carbohidratos el Mg^{2+} y Ca^{2+} revelaron un comportamiento entre el 22 y 32%, por su parte el Fe^{3+} entre el 31 y 51%, en tanto que el Si^{4+} , Se^{2-} , S^{2-} , Zn^{2+} y Cu^{2+} mostraron un rango de

variación entre el 24 y 48%, (figuras 10 a-h, tablas 3-10). Es en base a la fracción orgánica que es más claro el comportamiento de los lípidos y carbohidratos corroborando lo mencionado por Fernández Reiríz *et al.*, 1989, donde es acusado el aumento de los carbohidratos posibles responsables de la variación del peso orgánico en cultivos en fase estacionaria.

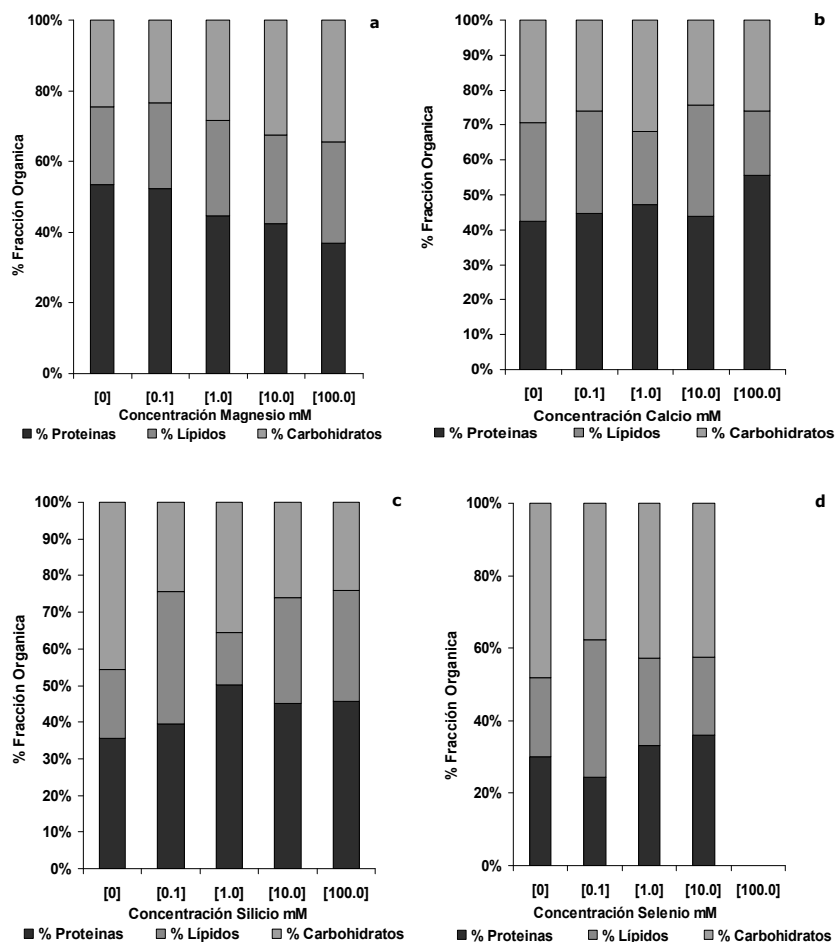


Figura 10.- Porcentajes de proteínas, lípidos y carbohidratos, respecto la concentración de elementos en *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo: (a) Mg^{2+} , (b) Ca^{2+} , (c) Si^{4+} , (d) Se^{2-} .

El valor calórico celular para Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} , y Cu^{2+} incremento con la concentración mM de estos, mostrándonos una tendencia hiperbólica positiva en el rango de $1,80$ y $3,44 \times 10^{-7} \text{ J.cél}^{-1}$ (tabla 3-10), con una tasa de renovación del 30%; valores muy similares a los reportados por Ferreira, 2006 con $3,17 \times 10^{-7} \text{ J.cél}^{-1}$ en su estudio con diferentes intensidades de luz. Solo en algunos casos como en el Si^{4+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} el máximo del valor calórico coincidió con el máximo de densidad celular en cultivo semicontinuo, motivo de la óptima concentración del elemento. En tanto que en el Mg^{2+} , Ca^{2+} , Se^{2-} Fe^{3+} y S^{2-} no se observó este comportamiento y esto debido a la evolución de la composición bioquímica celular (tabla 3-10), que sin duda responde a las necesidades fisiológico celulares ya descritas por algunos autores (O'Kelley, 1974; McCarthy, 1980; Kaplan *et al.*, 1990). Whyte 1987, menciona que una gran variedad de especies microalgales poseerán un mayor contenido energético en fase estacionaria de crecimiento.

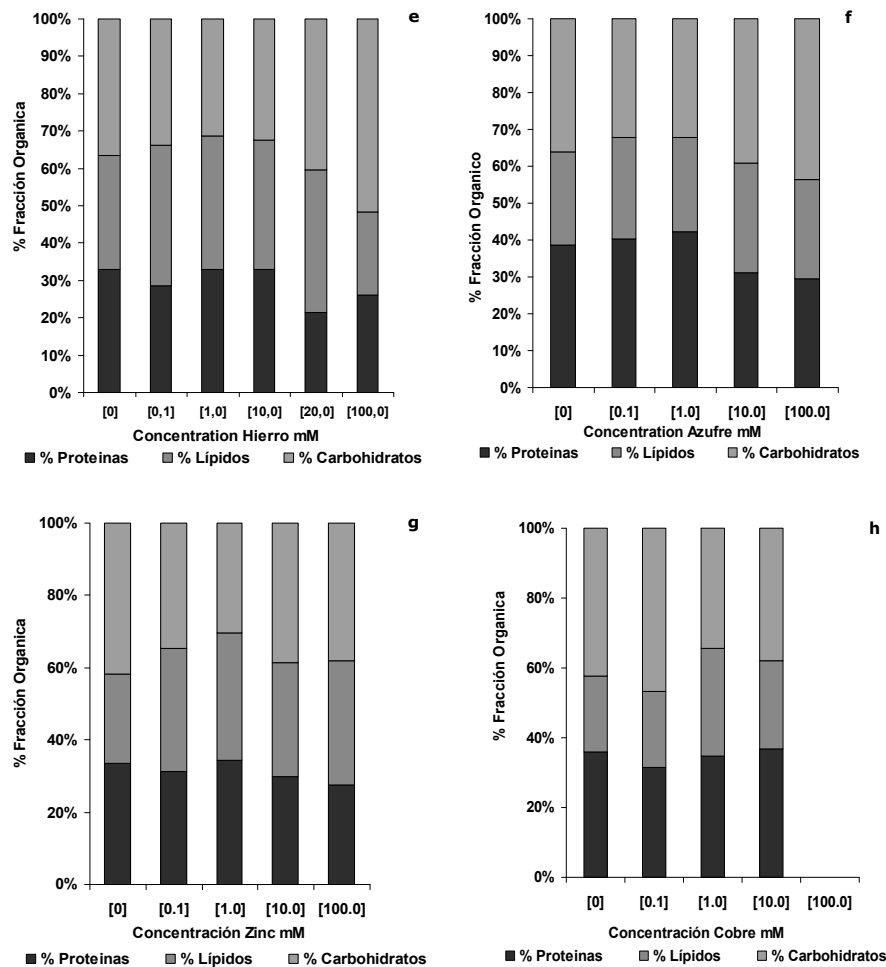


Figura 10.- Porcentajes de proteínas, lípidos y carbohidratos, respecto la concentración de elementos en *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo: **(e)** Fe^{3+} , **(f)** S^{2-} , **(g)** Zn^{2+} , **(h)** Cu^{2+} .

El peso seco celular de cada elemento en base a su concentración evolucionó en el rango de 17 y 7 pg.cel^{-1} , que correspondió con la evolución de el peso orgánico (proteínas+carbohidratos+lípidos pg.cel^{-1}) en el rango de 14,17 y 5,86 pg.cel^{-1} ; y por ende con el contenido de materia orgánica por célula (tablas 3-10), mostrando diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las concentraciones experimentadas ($p<0,05$) y coeficientes de correlación r^2 hiperbólicos positivos entre 0,94 y 0,99 (tabla 11). Los valores máximos de los parámetros celulares antes mencionados no coincidieron con los puntos máximos de generación de densidad celular (tablas 3-10). En lo referente al contenido celular de cenizas como se puede observar en la figura 11 a-h, el valor de estas en todos los elementos, se incrementó de manera hiperbólica hasta un óptimo conforme aumento la concentración del metal ($p<0,05$) (tabla 3-10) en el rango de 1,04 y 3,44 pg.cel^{-1} , mostrando coeficientes de correlación r^2 polinomial positivos entre 0,92 y 0,99 (tabla 11). Es en base a los resultados de cenizas que el peso orgánico se redujo en la medida que existió un óptimo de concentración del elemento como se puede observar en las tablas 3-10. La variable ceniza se encuentra en forma contraria a estas otras variables lo que implica que el tiempo de residencia de los elementos vía el cultivo semicontinuo en este estudio al 30% de tasa de renovación induce la acumulación de los elementos en el interior celular, con el fin de

compensar la elevada presión osmótica del medio de cultivo que es rica en nutrientes minerales.

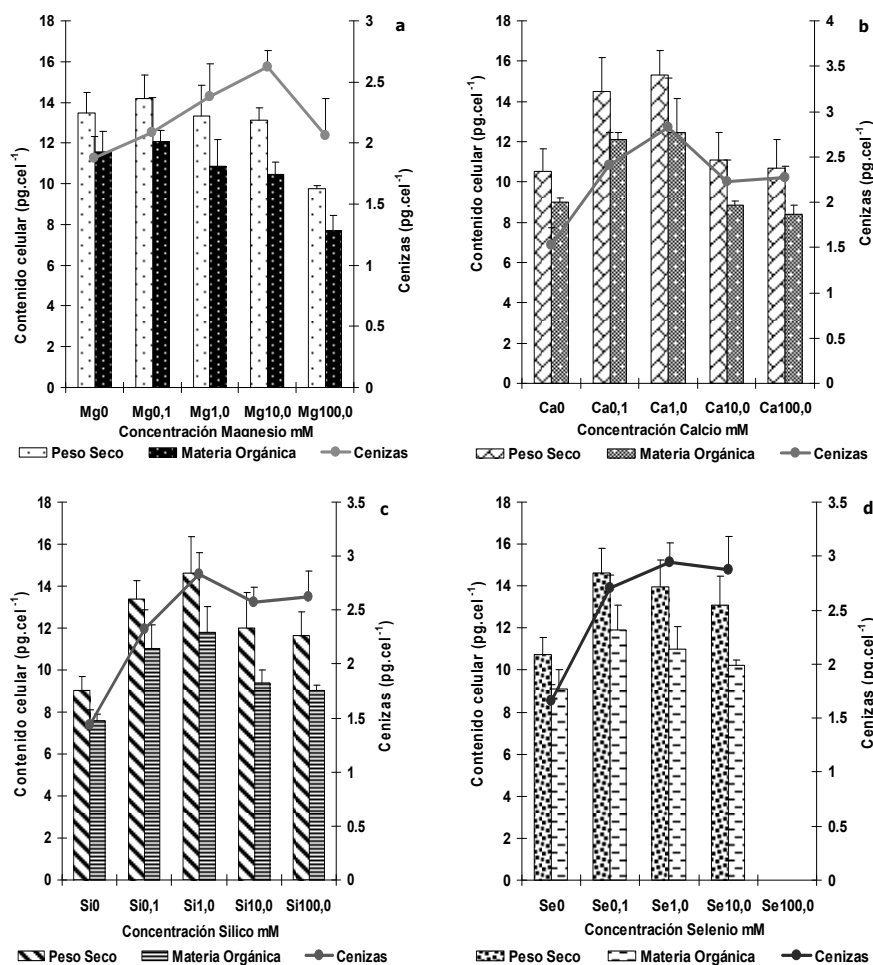


Figura 11.- Contenido celular: peso seco, materia orgánica y cenizas (pg.cel^{-1}) respecto la concentración de elementos en *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo: **(a)** Mg^{2+} , **(b)** Ca^{2+} , **(c)** Si^{4+} , **(d)** Se^{2-} . Media \pm SD ($n=3$).

Estudios realizados sobre la influencia en la concentración de nutrientes y la tasa de crecimiento sobre el contenido de cenizas contribuyen a poca información clarificadora sobre si un incremento del contenido celular en cenizas podría ser responsable de un descenso en Q_N en condiciones no limitantes (Otero, 1994), siendo que en nuestro estudio fue completamente al contrario ya que Q_N se incremento en respuesta al incremento de las cenizas *tablas* (3-10). Sin embargo algunos autores (Fernández Reiríz *et al.*, 1989) en cultivos masivos han descrito un mayor contenido de cenizas en la fase exponencial de crecimiento que en fase estacionaria, otros más (Thomas *et al.*, 1984; Whyte 1987) no encuentran una tendencia definitiva de la presencia de cenizas con la concentración de nutrientes en cultivo discontinuo o en distintas fases de crecimiento en cultivos masivos.

En el presente estudio todos los elementos se acumularon de forma hiperbólica positiva respecto a la concentración de estos en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30% (tabla 3-10). Otero, 1994 menciona que aun cuando exista una reducción del contenido orgánico celular que en nuestro caso se observó después del óptimo elemental existe un incremento del contenido de cenizas.

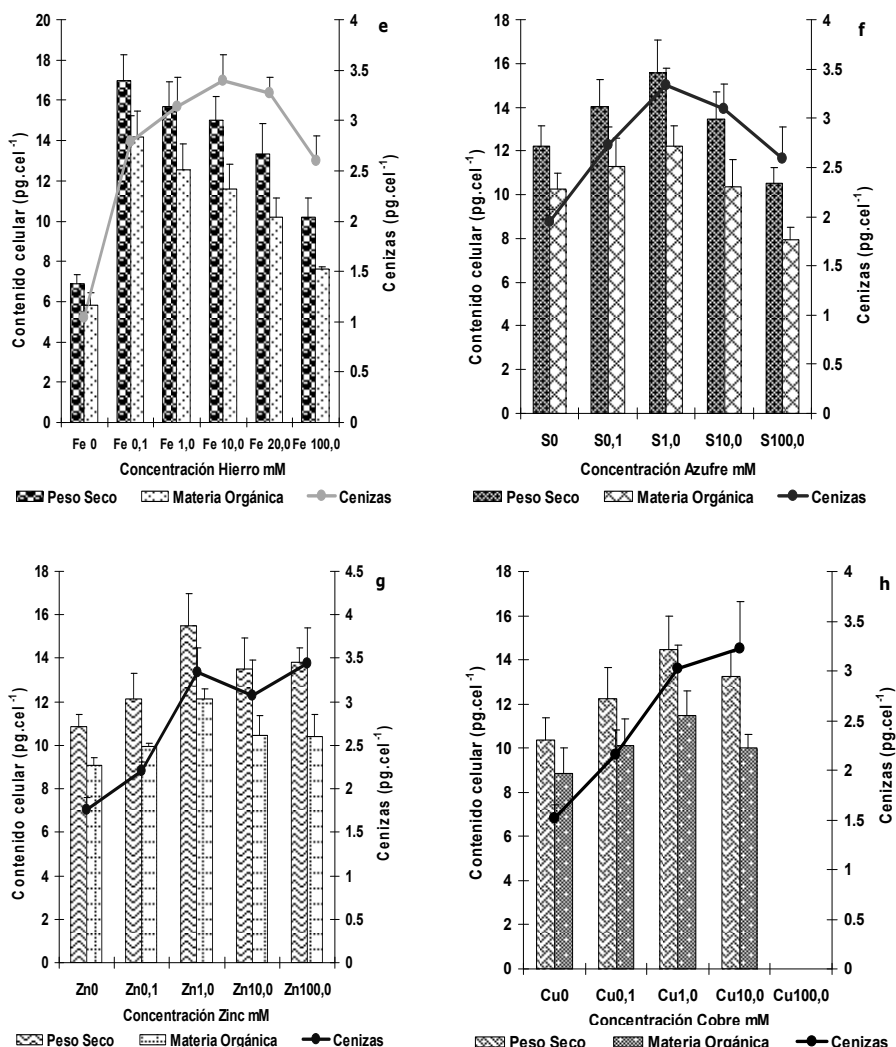


Figura 11.- Contenido celular: peso seco, materia orgánica y cenizas (pg.cel^{-1}) respecto la concentración de elementos en *I. galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo: **(e)** Fe^{3+} , **(f)** S^{2-} , **(g)** Zn^{2+} , **(h)** Cu^{2+} . Media \pm SD ($n=3$).

La incorporación de elementos en las microalgas se produce en dos fases, la primera que es muy rápida es la adsorción fisicoquímica en la superficie de las células, y la segunda fase que es muy lenta, es la acumulación intracelular (dependiente del metabolismo). Moreno-Garrido *et al.*, 1998, 1999; Schmitt *et al.*, 2001; Bhatnagar *et al.*, 2002 informan que las microalgas acumulan grandes cantidades de elementos como el cobre, silicio y calcio el cual no segregan al medio de cultivo hasta después de algún tiempo.

La incorporación en cultivo semicontinuo de Mg^{2+} , Se^{2-} , Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} y Cu^{2+} en *Isochrysis galbana* var. T-iso, fue muy eficiente con tendencia lineal (figura 12 a-b), conforme a la concentración, con coeficientes de correlación polinomial r^2 positivos de 0,94,

0,94, 0,88, 0,86, 0,95, 0,96 respectivamente; en tanto que para el Ca^{2+} y Si^{4+} la absorción fue hiperbólica hasta la concentración 10 mM, para disminuir con la concentración 100 mM (figura 12 a-b) mostrando coeficientes de correlación polinomial r^2 positivos de 0,93, 0,79, comparativamente, existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones experimentadas ($p<0,05$) (tabla 3-10). Dicha incorporación elemental concuerda con la evolución del contenido celular de cenizas descrito en las tablas 3-10, al respecto Fábregas *et al.*, 1996a; Fábregas *et al.*, 1996b mencionan que *Phaeodactylum tricornutum* incrementa su volumen celular con la tasa de renovación lo que sugiere un mayor contenido de minerales por otra parte Reboloso Fuentes *et al.*, 2000 mencionan que si los minerales son biodisponibles, no tóxicos o antinutricionales serán empleados fisiológicamente y nutricionalmente por las células en adecuado balance de su concentración (Carvalho *et al.*, 2006). Un incremento en la concentración del elemento provoca un descenso del peso orgánico acompañado de variaciones en el peso seco celular, el cual experimenta un óptimo para después decrecer hiperbólicamente. En condición de abundancia de nutrientes, las microalgas captan mayores cantidades de elementos del medio, es así que la presión osmótica celular aumenta, dando lugar a una mayor absorción de aniones y cationes. Darley, 1987, menciona que es debido tal fenómeno a que en los diferentes medios de cultivo la presencia del ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) ayuda ya sea a incrementar la disponibilidad de los elementos presentes o disminuir los niveles tóxicos de los iones libres.

La disminución del contenido orgánico celular en *Isochrysis galbana* var. T-iso fue compensado con un incremento del contenido del elemento y cenizas (tablas 3-10) conforme se incremento la concentración de este. Son diversos los mecanismos activos y pasivos para la incorporación de metales por las microalgas (Otero, 1994). La pared celular de las microalgas tienen una gran capacidad para secuestrar o incorporar elementos (Wang *et al.*, 1998). Este hecho es de una importancia especial, ya que las microalgas marinas constituyen el primer eslabón de la cadena trófica marina y por lo tanto, pueden transferir metales esenciales a niveles tróficos superiores (Folgar *et al.*, 2009); los cuales son de gran importancia ya que son responsables de una gran cantidad de procesos enzimáticos, antioxidantes y fisiológicos, que coadyuvan a mecanismos formadores de membrana, así como intervenir en procesos de metamorfosis en estadios larvales tempranos. Ferreira, 2006 en su estudio de incorporación de oligoelementos en cultivo semicontinuo en *Isochrysis galbana* var. T-iso menciona que a tasas de renovación entre el 30% y 50% inicia la saturación por nutrientes, con lo cual la tasa de incorporación celular de elementos se hace mas eficiente, situación que así sucedió con todos los elementos en nuestros cultivos a una tasa de renovación del 30%.

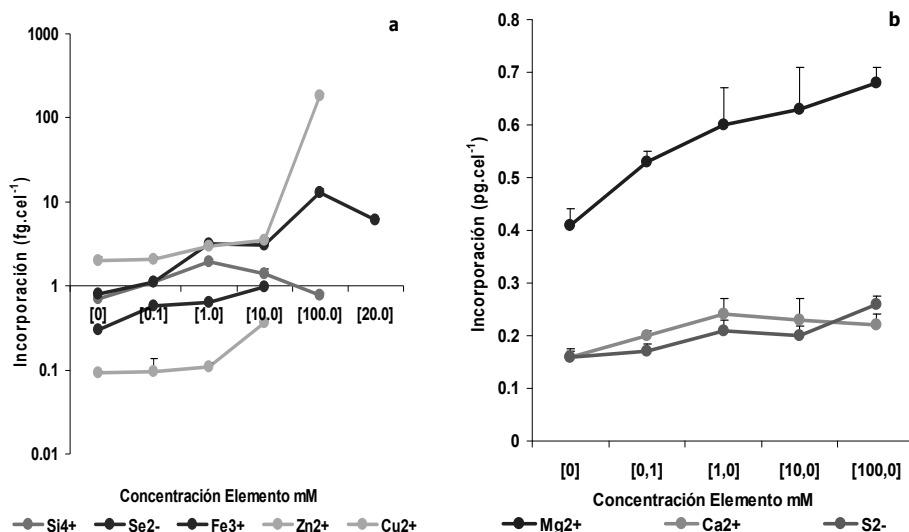


Figura 12.—Incorporación celular de elementos en *Isochrysis galbana* var. T-iso. en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ : **(a)** Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , **(b)** Ca^{2+} , Mg^{2+} , S^{2-} .

En el presente estudio los ácidos grasos (AG) más abundantes en *Isochrysis galbana* var. T-iso los representaron el 14:0, 16:0, 18:1(n-9) (Reitan *et al.*,1994) los cuales evolucionaron por si solos y con respecto a la concentración de los elementos en el rango del 10 al 30% (Lin *et al.*,2007); estimándose en conjunto entre el 60 y 80% del total de los AG (tablas 13-19) resultados por encima de los reportados por Renaud *et al.*,1999 con 65 y 75%; y similares con los descritos por Ben-Amotz *et al.*,1985; Mourente *et al.* 1990. Nuestros datos coinciden con diversos autores como Reitan *et al.*,1994; McCausland *et al.*,1999; Fernandez-Reiriz *et al.*,1999; Nevejan *et al.*,2003; Devos *et al.*,2006; Lin *et al.*,2007; Delaporte *et al.*,2007 describiendo que tal Haptofita posee al ácido mirístico (14:0) y palmítico (16:0) como los principales ácidos grasos saturados, además del ácido palmitoleico (16:1(n-7) que en este estudio fluctuó entre el 4 y 12% y elaídico (18:1(n-9) como los principales ácidos grasos monoinsaturados, siguiendo en importancia respecto a su concentración el ácido linoleico (18:2(n-6), alfa-linolénico (18:3(n-3), eicosapentaenoico (20:5(n-3), docosapentaenoico (22:5(n-6) y docosahexaenoico (22:6(n-3) el cual fluctuó independientemente del elemento aquí experimentado entre el 4 y 12,60 % de los ácidos grasos totales valores por arriba de los hallados por Renaud *et al.*,1999 con 9,9% y muy cercanos a los reportados por Devos *et al.*,2006 y Lin *et al.*,2007 con 13,5 y 13,7%. Tales elementos en el medio de cultivo nos demuestran cuan versátil suele resultar *Isochrysis galbana* var. T-iso en el metabolismo de los lípidos y con ello inducir la cantidad de sus ácidos grasos principales (Harwood and Guschina, 2009; Mata *et al.*,2010).

Cada elemento con base en las diferentes concentraciones ensayadas, mostraron diversos grados de evolución respecto a incrementar o decrecer porcentualmente tales AG. Siendo un hecho que en base a la concentración del ácido palmítico (16:0) y palmitoleico (16:1(n-7)) fue posible la elongación y desaturación vía enzimática (Huang *et al.*, 2010) a otros ácidos grasos de cadena más larga, importantes y de concentración apreciable en esta haptofita, como lo fueron el 18:0, 18:1(n-9), 18:1(n-7), 18:2(n-6), 18:3(n-3), 18:4(n-3) que originaron series de otros AG insaturados de cadena aun más larga como son el ácido araquidónico (20:4(n-6), (20:4(n-3), eicosapentaenoico (20:5(n-3), 22:1, 22:5(n-6) y docosahexaenoico (22:6(n-3) (tabla 12-19). Destacando el ácido graso docosahexaenoico el cual con los diferentes elementos y concentraciones probadas se incremento en el rango de los 4 a 12,26% de los ácidos grasos totales, al respecto Lin *et al.*, 2007 menciona que el incremento del ácido docosahexaenoico (22:6(n-3) es debido al aumento del ácido palmítico (16:0), esteárico (18:4(n-3) y docosapentaenoico (22:5(n-3); tal y como sucedió en el presente estudio en la medida que se llegó a un óptimo en base a la concentración del elemento, en el medio de cultivo; con coeficientes de correlación r^2 entre 0,55 y 0,95 (tabla 11), y que es reflejo de la evolución de los lípidos celulares. Ese óptimo de concentración solo correspondió con el máximo contenido de ácidos grasos totales (AGT) por célula en el Se^{2-} , S^{2-} , Zn^{2+} y Cu^{2+} con una tasa de renovación del 30% (tabla 12-19); existiendo en la concentración del DHA y el contenido de AGT diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$).

En *Isochrysis galbana* var. T-iso el DHA y 14:0, pueden encontrarse en cantidades tan altas como 25 y 50%, respectivamente. El 16:0 y 18:1 n-9 están presentes en niveles en torno al 10%, mientras que los otros ácidos grasos representan proporciones muy bajas de los ácidos grasos totales (menos del 5%) (Lin *et al.*, 2007).

El máximo contenido de AGT $\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$ que correspondió, del contenido lipídico celular en *Isochrysis galbana* var. T-iso por elemento fue el siguiente: Mg^{2+} (34,46%), Ca^{2+} (37,57%), Si^{4+} (56,80%), Se^{2-} (25,05%), Fe^{3+} (21,17%), S^{2-} (35,14%), Zn^{2+} (54,67%) y Cu^{2+} (28,21%). Valores superiores a los descritos por Ferreira, 2006 en sus estudios sobre fuente de CO_2 e intensidad lumínica describiendo valores entre 19 y 31%. Volkman *et al.*, 1989 y Devos *et al.*, 2006 mencionan que tales porcentajes de AG respecto de los AGT son debidos a que *Isochrysis galbana* var. T-iso presenta una gran variedad de clases de lípidos (lípidos neutros, glucolípidos y fosfolípidos) por lo que una gran parte de estos son lípidos no formados por ácidos grasos (no acílicos), tales como esteroides, hidrocarburos, alquenonas o pigmentos. Lípidos no formados por ácidos grasos que más contribuyen al contenido lipídico en esta haptofita son las alquenonas, metil y etilalquenonas, alquenoatos, y alquenos de cadena larga entre 36 y 39 carbonos, frecuentemente con dobles enlaces (Volkman *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1993; Versteegh *et al.*, 2001; Eltgoth *et al.*, 2005).

Los perfiles de ácidos grasos de los lípidos tanto neutros y fracciones glucolípídicas no son muy diferentes de la fracción lipídica total. Sin embargo, la fracción de fosfolípidos la mas importante muestra una muy diferente composición de ácidos grasos (Tocher *et al.*, 2008). Devos *et al.*, 2006 indican que una vez cuantificado la concentración de DHA en las diferentes clases de lípidos se pudo observar que los fosfolípidos representan 75% del DHA total por célula. En microalgas, los lípidos polares (fosfolípidos y glicolípidos) generalmente contienen grandes cantidades de PUFA n-3 de lípidos neutros. Por otra parte Reitan *et al.*, 1994 mencionan con limitación de fosforo un rango de variación entre 32 y 53% valores muy cercanos a los obtenidos en el presente estudio. La fracción relativamente baja de ácidos grasos, probablemente puede explicarse por altas fracciones de ácidos grasos inusuales, junto con un alto contenido de lípidos no formadores de ácidos grasos (Kayama *et al.*, 1989) y que se demuestra con nuestros resultados.

Se observaron importantes diferencias en la evolución porcentual y pg.cel^{-1} de los ácidos grasos saturados (AGS) mas los monoinsaturados (AGM) con respecto a los poliinsaturados (AGP), existiendo en los dos casos diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$), con r^2 que se expresan en la *tabla 11*; donde el decremento de los AGS más AGM correspondió con el incremento de los AGP *figuras 13 a-h* y *tablas 12-19*; que además coincidió con la concentración óptima del Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} y Cu^{2+} para la máxima generación porcentual del ácido graso poliinsaturado docosahexaenoico (22:6 n-3, DHA) con valores de 5,83, 3,92, 0,91, 5,36, 10,06, 12,60, 8,81 y 9,44 respectivamente (*tabla 12-19*); existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$).

Algunos de estos valores como los del Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} y Cu^{2+} superan las concentraciones de DHA descritas por Ferreira, 2006 con la misma tasa de renovación, en estudios sobre la presencia de CO_2 y diferentes intensidades lumínicas con valores de 6,4 y 9,66%. Lin *et al.*, 2007 mencionan que los AGS y los AGM así como los AGP subtotales aumentan de manera exponencial a principios de la fase estacionaria para posteriormente disminuir en la fase estacionaria tardía. *Isochrysis galbana* var. T-iso posee entre un 66,9% y 80% de AGS+AGM; tal rango de variación concuerda con los resultados aquí descritos (*tabla 12-19*) para la gran mayoría de los elementos probados.

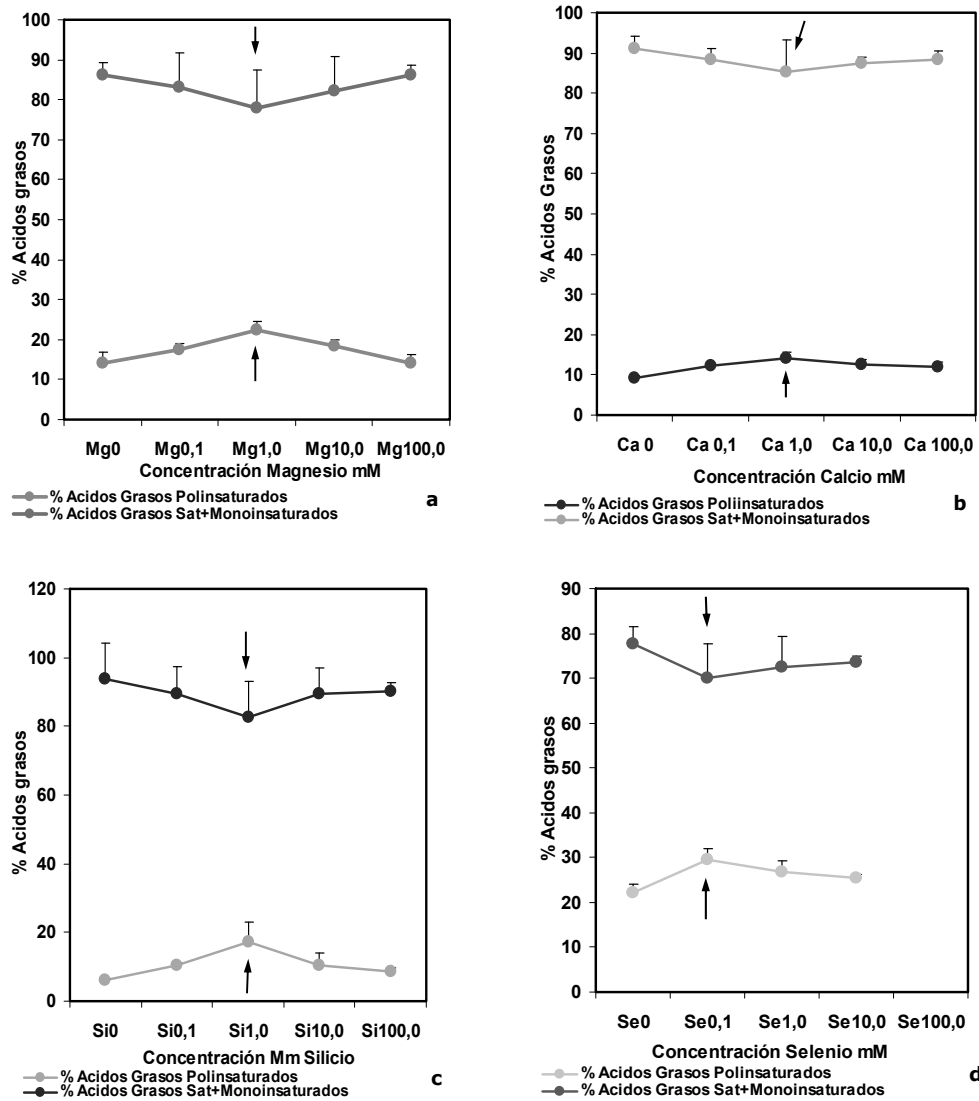
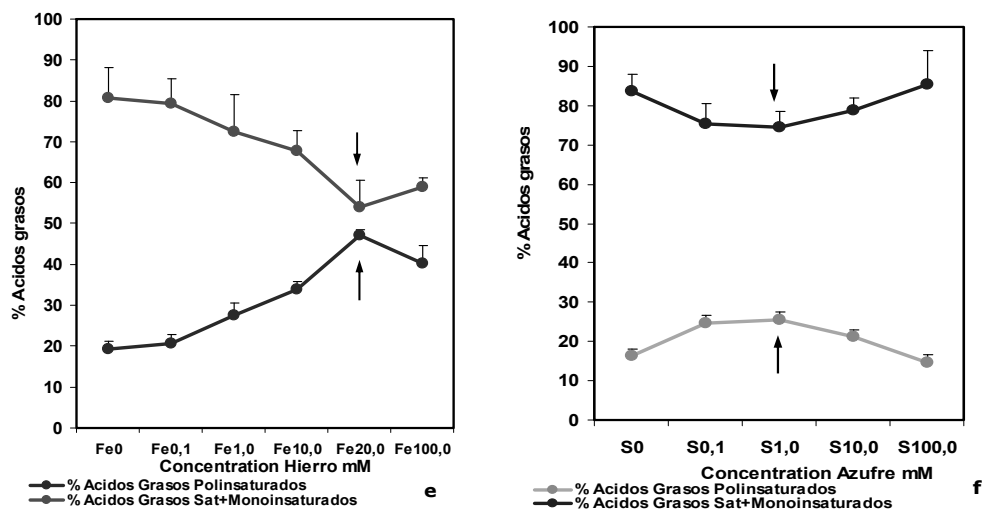


Figura 11.- Evolución porcentual del contenido de ácidos grasos con respecto a la concentración del elemento en *I. galbana* var T-iso en cultivo semicontinuo: (a) Mg^{2+} , (b) Ca^{2+} , (c) Si^{4+} , (d) Se^{2-} .



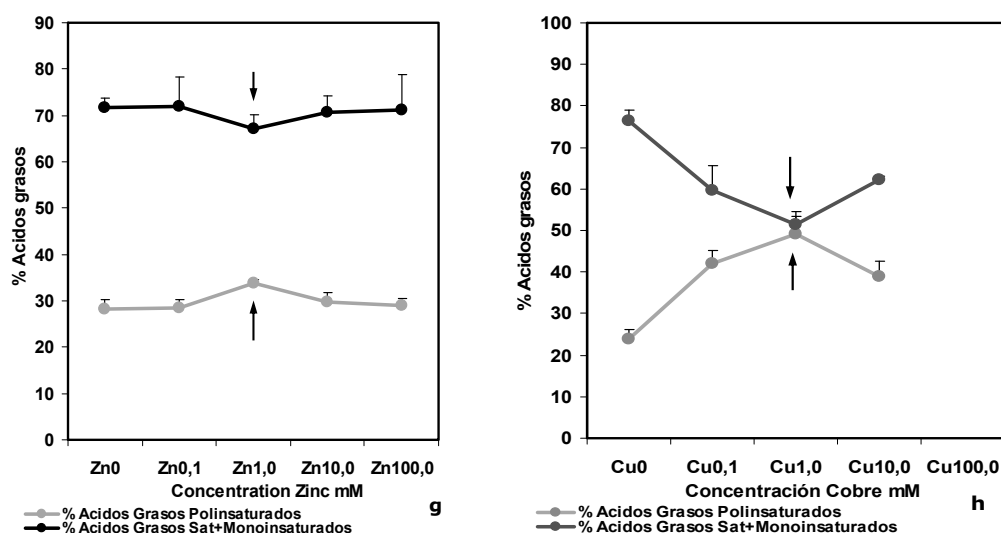


Figura 11.- Evolución porcentual del contenido de ácidos grasos con respecto a la concentración del elemento en *Isochrysis galbana* var T-iso en cultivo semicontinuo: **(e)** Fe^{3+} , **(f)** S^{2-} , **(g)** Zn^{2+} , **(h)** Cu^{2+} .

El incremento en la concentración del elemento vía la máxima generación de lípidos que coincide con Q_c (tabla 3-10), que es la base o fuente de producción o generación de los lípidos (Huang *et al.*, 2010); desplaza la formación de lípidos neutros o triglicéridos los cuales poseen ácidos grasos de baja insaturación por fosfolípidos o galactolípidos (lípidos polares) en la forma de sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) y fosfatidilglicerol (PG) (Goss *et al.*, 2009) y que en las haptofitas así como en la mayoría de las diatomeas representan el 40% de los AG poliinsaturados de las series ω -3 y ω -6 (Mata *et al.*, 2010).

Dentro del grupo de los ácidos grasos poliinsaturados se encuentran tres grandes familias, mediante las cuales se derivan los procesos de elongación a ácidos grasos de cadena larga como son la **serie ω -3, ω -6 y ω -9**; de los cuales las series importantes son la ω -3 y ω -6, así mismo la proporción entre estas dos series es de relevante importancia en el valor energético celular en los siguientes niveles tróficos, por lo que una mayor proporción de los ω -3 es imprescindible en mecanismos formadores de membrana en etapas tempranas de desarrollo larval de organismos marinos. Es así que las proporciones de ácidos grasos **ω -3: ω -6** por célula de *Isochrysis galbana* var. T-iso tendieron a incrementarse con la concentración de cada elemento ensayado (tabla 12-19), en el medio de cultivo, por lo tanto se hallaron diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$), con índices de correlación entre 0,31 y 0,97 (tabla 11). La proporción porcentual optima de los AG **ω -3: ω -6** respecto a la concentración del elemento se encontró entre 1,71 y 15,89 (tabla 12-19), valores del S^{2-} (15,89%) y el Cu^{2+} (7,74%) estuvieron por encima de los reportados por Ferreira, 2006 (5,73%) empleando diferentes intensidades de luz. Por otra parte Lin *et al.*, 2007 con la misma especie de haptofita que el presente estudio demostró valores entre 2,3 y 4,9% entre fase exponencial y fase estacionaria tardía en fotobioreactores batch con medio de cultivo Walne rico en complejos de hierro, datos por debajo de los obtenidos con la gran mayoría de los elementos aquí estudiados.

La proporción $\omega\text{-3}:\omega\text{-6}$ representa el cociente entre los ácidos grasos correspondientes a los grupos omega 3 y omega 6, siendo un parámetro para estimar el valor nutritivo celular de las microalgas. Una alta proporción ácidos grasos altamente poliinsaturados $\omega\text{-3}$ a $\omega\text{-6}$ se ha utilizado como un índice de alto valor nutritivo para los organismos en acuicultura (Fidalgo *et al.*, 1998).

Un aspecto importante desde el punto de vista nutricional en niveles superiores de la trama trófica alimenticia; es la proporción que existe del total de los ácidos grasos, el ácido docosahexaenoico (22:6n-3 DHA), eicosapentaenoico (20:5n-3 EPA) y el ácido araquidónico (20:4n-6 ARA), tal proporción es muy importante en la alimentación de las primeras etapas de desarrollo larval.

En los peces planos, la metamorfosis y el desarrollo de la pigmentación son controlados a nivel nervioso y neuroendocrinológico. En consecuencia, la producción anormal de eicosanoides en el cerebro como resultado de la alteración de los niveles de ARA y EPA trae consigo graves consecuencias para el desarrollo y la metamorfosis de las larvas de peces planos, incluyendo su anormal pigmentación; por lo que la proporción de EPA que promueve la formación de membranas a nivel celular sobre la proporción de ARA deberá ser siempre superior (Estévez *et al.*, 1999).

En el presente estudio motivo de la inclusión de diferentes concentraciones de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} y Cu^{2+} en *Isochrysis galbana* var. T-iso logramos incrementar tal proporción EPA/ARA con respecto a un control (0 mM del elemento) en el rango de 1,16:1% al 11,28:1% por célula como se puede observar en las *tablas 12-19* existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,002$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$). Valores importantes en proporción ya que Estévez *et al.*, 2001; Bell *et al.*, 2003 concluyen que una alta incidencia en la malpigmentación de larvas de peces planos es debida a un pobre enriquecimiento de las presas vivas vía las microalgas con una proporción 0,3:1% de EPA/ARA en contraste con un óptimo de proporción 4,1:1% de EPA/ARA donde problemas de malpigmentación en estadios larvales tempranos de peces planos no fueron evidentes, Sargent *et al.*, 1999 mencionan que una proporción 4,2:1 EPA/ARA es esencial para una normal supervivencia, crecimiento, pigmentación y metamorfosis en larvas de rodaballo; nuestros resultados superan en algunas ocasiones en 3 ordenes de magnitud dichos óptimos de proporción EPA/ARA. Un exceso en la producción de eicosanoides derivados del ácido araquidónico en el cerebro o en la pituitaria de larvas, vía estrés altera el control neuroendocrino de los procesos implicados en el desarrollo de la pigmentación durante la metamorfosis de peces planos (Estévez *et al.*, 1999).

Los peces marinos contienen grandes cantidades de ácido docosahexaenoico (22:6 n-3 DHA) eicosapentaenoico (20:5n-3 EPA) en los fosfolípidos de las membranas celulares. Los peces marinos no pueden biosintetizar DHA *de novo*, ni de los precursores de cadena más corta, como es el ácido alfa-linolénico (18:3 n-3). Por lo tanto, DHA y EPA serán componentes esenciales de la dieta en los peces marinos. El DHA está presente en concentraciones muy elevadas en las membranas de células neuronales y visuales,

particularmente en las membranas celulares externas así como membranas sinaptosomales, en peces como en mamíferos (Sargent *et al.*, 1997, 1999).

Por lo tanto, una insuficiencia de DHA en la dieta en etapas larvales tempranas de peces marinos es que puede perjudicar el desarrollo neurológico y visual con graves consecuencias para una serie de procesos fisiológicos y de comportamiento incluyendo los que dependen neuroendocrinológicamente.

Pigmentación anormal es común en los cultivos de larvas de peces planos marinos, y se puede mejorar sustancialmente rectificando el nivel de DHA en las larvas mediante el alimento vivo (Kanazawa *et al.*, 1981; Kanazawa, 1993; Reitan *et al.*, 1994b; McEvoy *et al.*, 1998b). Se ha considerado que la mal pigmentación puede ser consecuencia de un mal funcionamiento neuronal o visual, por ejemplo, de procesamiento anormal de las señales visuales, ya sea en el propio ojo, o posteriormente en el cerebro, desde la producción anormal de la hormona estimulante de melanocitos en el cerebro, de frente a perturbaciones en las conexiones sinápticas entre los nervios y el melanóforos en la piel. El síndrome de mal pigmentación es causado por una deficiencia de DHA o un exceso de EPA, por lo que diversos autores han documentado la importancia de una alta razón DHA:EPA (Kraul, 1993; Mourente *et al.*, 1993; Reitan *et al.*, 1994b; Lavens *et al.*, 1995).

Es así que las proporciones de ácidos grasos **DHA/EPA** por célula tendieron a incrementarse con la concentración de cada elemento ensayado (*tabla 12-19*), se hallaron diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$), con índices de correlación entre 0,53 y 0,96 (*tabla 11*). La proporción porcentual de los AG **DHA/EPA** en los elementos estudiados se encontró entre 5:1% y 23,39:1% (*tabla 12-19*), destacar que la proporción **DHA/EPA** encontrada con la mayoría de los elementos aquí estudiados supera lo reportado por Reitan *et al.*, 1994b en Sargent *et al.*, 1999 donde logra eliminar la mal pigmentación de larvas de rodaballo incluyendo aceite refinado de atún rico en DHA en proporción **DHA/EPA** 2:1%. Es de destacar que esta es esencialmente la misma proporción de DHA/EPA que existe en la yema de los muchos huevos y larvas de peces marinos (Tocher and Sargent, 1984).

Sui *et al.*, 2007 observo que en larvas de cangrejo chino *Eriocheir sinensis* proporciones dietarias DHA/EPA de 0,68:0,28 mostraban un inferior desarrollo larval y supervivencia con respecto a tratamientos con altas proporciones dietarias DHA/EPA de 2,85:1,17; lo que indica que altos niveles de ácidos grasos altamente poliinsaturados y en correcto balance DHA y EPA mejoran la respuesta larval al estrés. Por otra parte George *et al.*, 2008 empleando a la microalga *Isochrysis galbana* var. T-iso como dieta en el cultivo de larvas del equinodermo *Dendraster excentricus* obtuvieron buen crecimiento, metamorfosis y desarrollo con proporciones DHA/EPA 7,43:1%.

En lo que respecta a las proporciones de ácidos grasos **DHA/ARA** por célula mostraron una evolución a incrementarse con la concentración de cada elemento ensayado (*tabla 12-19*), hallándose diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$), con índices de correlación entre 0,62 y 0,96 (*tabla 11*). La proporción porcentual de los AG **DHA/ARA** en los elementos estudiados se encontró entre 4,21:1% y 67,07:1% (*tabla 12-19*). Los requerimientos para estos ácidos grasos esenciales no pueden ser considerados separadamente. Alterándose la dosis dietaria de uno

de ellos tendrá influencia en el balance de **ARA:EPA:DHA** debido a interacciones competitivas y conversiones metabólicas (Sargent *et al.*, 1999)

El uso de microalgas específicas como fuentes de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), ya sea para su incorporación en la acuicultura o la dieta humana, recibe un creciente interés. El perfil de ácidos grasos intracelular en una especie determinada es posible dentro de ciertos límites manipularlo, ya sea sobre su metabolismo, modulando los parámetros de crecimiento microalgal; o la correlación entre los componentes del medio de cultivo (Carvalho *et al.*, 2006). La nutrición mineral y los efectos de la variación en la composición del medio de cultivo en la producción de ácidos grasos es posible mediante la inclusión en el medio de cultivo de ciertos elementos que además de cumplir con funciones fisiológicas celulares, coadyuvan en la calidad bioquímica de la misma. Comportamientos similares en la cantidad de los ácidos grasos han sido manifestados por Feng *et al.*, 2005; los cuales concluyen que la adición en el medio de cultivo de moléculas orgánicas e inorgánicas mejora la producción de lípidos y ácidos grasos poliinsaturados en microalgas.

Reboloso Fuentes *et al.*, 2000 mencionan que los minerales si son biodisponibles y no tóxicos en la microalgas estas podrían ser utilizadas con fines alimenticios, debido a la cantidad y la diversidad de nutrientes que contienen. Además, de que la composición de la biomasa puede ser modificada por medio de variables operacionales, principalmente mediante el uso de los tiempos de residencia corta para obtener mayores concentraciones de AG poliinsaturados como el EPA, además de un mayor enriquecimiento por proteína.

Tabla 3
Cultivo en semicontinuo de *Isochrysis galbana* var T-iso + MAGNESIO
Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L
Tasa de renovación 30%.día⁻¹

	0 mM	0.1 mM	1.0 mM	10.0 mM	100.0 mM
Densidad celular (10 ⁶ cél.mL ⁻¹ std)	21,75a ±1,95	27,50ab ±2,46.	31,00b ±1,35	73,50d ±6,15	38,75c ±2,98
Productividad (10 ⁹ céls.L ⁻¹ .día ⁻¹)	6.52	8.25	9.30	22.05	11.62
% proteína en F.O.	53,31	52,39	44,59	42,32	36,83
% carboh. en F.O.	22,26	24,25	27,03	25,14	28,68
% lípidos en F.O.	24,42	23,35	28,37	32,53	34,49
Proteína (pg.cél ⁻¹ ± std)	6,18cd ±062	6,33d ±0.58	4,89bcd ±0.40	4,44ab ±0.42	2,84a ±0.060
Carbohidratos (pg.cél ⁻¹ ± std)	2,83ab ±0.23	2,82ab ±0.095	3,11bc ±0.084	3,42c ±0.14	2,66a ±0.047
Lípidos (pg.cél ⁻¹ ± std)	2,58b ±0.13	2,93c ±0.052	2,96c ±0.067	2,64b ±0.051	2,20a ±0.22
Peso orgánico (pg.cel ⁻¹)	11,59	12,08	10,96	10,50	7,71
Valor calórico (10 ⁻⁷ J.cél ⁻¹)	2.98	3.16	2.87	2.69	2.00
Peso seco (µg.mL ⁻¹ ±std)	403,53 ±21,66	620,13 ±24,66	674,30 ±41,30	2094,46 ±12,24	1077,41 ±24,34
Peso seco (pg.cel ⁻¹ ±std)	13,47c ±0,99	14,17d ±1,179	13,34c ±1,50	13,12b ±0,63	9,77a ±0,16
Cenizas (pg.cel ⁻¹ ±std)	1,88a ±0,167	2,09b ±0,28	2,38c ±0,27	2,62d ±0,14	2,06b ±0,73
Materia Orgánica (pg.cel ⁻¹ ±std)	11,56c ±1.01	12,06c ±0.55	10,87b ±1.32	10,46b ±0.61	7,69a ±1.75
Tasa Máxima Crecimiento (div.día ⁻¹)	2,46	2,51	2,38	2,32	1,85
Nitrógeno Residual (mM ± std)	1.97 ±0.14	1.53 ±0.12	1.49 ±0.139	0.00 ±0.00	0.46 ±0.02
Q_N celular (pg)	0,795a ±0.073	0,829b ±0.026	0,843c ±0.054	0,874d ±0.016	0,776a ±0.077
Q_C celular (pg)	8,122a ±0.247	8,561c ±0.157	8,839d ±0.219	9,476e ±0.219	8,384b ±0.266
RelaciónC:N(átomos)	8,76a	8,85ab	9,30b	9,27b	8,99ab
Absorción Atómica Mg (pg.cél ⁻¹ ± std)	0,41 ±0,03	0,53 ±0,02	0,60 ±0,07	0,63 ±0,08	0,68 ±0,03

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 4
Cultivo en semicontinuo de *Isochrysis galbana* var. T-iso + CALCIO
Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L
Tasa de renovación 30%.día⁻¹

	0 mM	0.1 mM	1.0 mM	10.0 mM	100.0 mM
Densidad celular (10 ⁶ cél.mL ⁻¹ std)	25,37a ±2,82	30,80b ±2,76	32,37b ±3,05	52,85d ±4,28	39,20c ±2,68
Productividad (10 ⁹ céls.L ⁻¹ .día ⁻¹)	7,61	9,24	9,71	15,85	11,76
% proteína en F.O.	42,56	44,67	47,19	43,89	55,47
% carboh. en F.O.	29,38	26,07	31,70	24,43	25,98
% lípidos en F.O.	28,06	29,25	21,11	31,67	18,57
Proteína (pg.cél ⁻¹ ± std)	3,82a ±0,26	5,39b ±0,19	5,88c ±0,79	3,89a ±0,36	4,66abc ±0,38
Carbohidratos (pg.cél ⁻¹ ± std)	2,64b ±0,37	3,15b ±0,39	3,95c ±0,24	2,17a ±0,25	2,18a ±0,094
Lípidos (pg.cél ⁻¹ ± std)	2,52b ±0,070	3,53d ±0,11	2,63b ±0,12	2,81c ±0,18	1,56a ±0,18
Peso orgánico pg.cel⁻¹	8,98	12,07	12,46	8,87	8,40
Valor calórico (10 ⁻⁷ J.cél ⁻¹)	2,36	3,22	3,11	2,41	2,10
Peso seco (µg.mL⁻¹ ±std)	712,3 ±11,33	781,50 ±28,11	771,63 ±46,73	964,40 ±70,55	819,0 ±28,11
Peso seco (pg.cel⁻¹ ±std)	10,51a ±1,141	14,48c ±1,71	15,29d ±1,25	11,10b ±1,34	10,67a ±1,44
Cenizas (pg.cel⁻¹ ±std)	1,53a ±0,19	2,41c ±0,36	2,83d ±0,54	2,23b ±0,23	2,27b ±0,13
Materia Orgánica (pg.cel⁻¹ ±std)	8,98b ±0,20	12,08c ±0,40	12,44d ±1,68	8,86b ±0,17	8,39a ±0,45
Tasa Máxima de Crecimiento (div.día⁻¹)	2,12	2,19	1,92	2,19	2,28
Nitrógeno Residual (mM ± std)	1,92 ±0,125	2,15 ±0,22	1,86 ±0,107	0,28 ±0,022	1,32 ±0,104
Q_N celular (pg)	0,651a ±0,063	0,692b ±0,040	0,695b ±0,021	0,703b ±0,060	0,677a ±0,076
Q_C celular (pg)	6,747a ±0,244	7,059ab ±0,64	7,258b ±0,206	7,409b ±0,122	7,097ab ±0,175
RelaciónC:N(átomos)	8,88ab	8,74a	9,04ab	9,49b	8,98ab
Absorción Atómica Ca (pg.cél ⁻¹ ± std)	0,16 ±0,01	0,20 ±0,01	0,24 ±0,03	0,23 ±0,04	0,22 ±0,02

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 5
Cultivo en semicontinuo de *Isochrysis galbana* var T-iso + SILICIO
Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L
Tasa de renovación 30%.día⁻¹

	0 mM	0.1 mM	1.0 mM	10.0 mM	100.0 mM
Densidad celular (10 ⁶ cél.mL ⁻¹ std)	27,20a ±2,50.	55,75c ±4,89.	85,25d ±6,56	42,87b ±3,97	43,40b ±4,25.
Productividad (10 ⁹ céls.L ⁻¹ .día ⁻¹)	8,16	16,72	25,57	12,86	13,02
% proteína en F.O.	35,71	39,40	50,21	45,07	45,69
% carboh. en F.O.	45,78	24,45	35,47	26,08	24,18
% lípidos en F.O.	18,51	36,14	14,31	28,84	30,13
Proteína (pg.cél ⁻¹ ± std)	2,72a ±0,20	4,35c ±0,26	5,93d ±0,14	4,25b ±0,30	4,12b ±0,40
Carbohidratos (pg.cél ⁻¹ ± std)	3,48c ±0,11	2,70b ±0,086	4,19d ±0,26	2,46ab ±0,13	2,18a ±0,10
Lípidos (pg.cél ⁻¹ ± std)	1,41a ±0,12	3,99c ±0,13	1,69ab ±0,11	2,72bc ±0,10	2,71bc ±0,15
Peso orgánico (pg.cel⁻¹)	7,61	11,05	11,81	9,42	9,01
Valor calórico (10 ⁻⁷ J.cél ⁻¹)	1,80	3,08	2,80	2,51	2,43
Peso seco (µg.mL⁻¹ ±std)	481,73 ±17,39	1255,06 ±50,87	2153,4 ±147,27	1117,90 ±71,89	1122,50 ±94,01
Peso seco (pg.cél⁻¹ ±std)	9,05a ±0,64	13,37c ±0,91	14,64d ±1,73	11,99b ±1,68	11,63b ±1,16
Cenizas (pg.cél⁻¹ ±std)	1,44a ±0,14	2,32b ±0,18	2,83d ±0,20	2,57c ±0,14	2,62cd ±0,24
Matéria Orgánica (pg.cél⁻¹ ±std)	7,60a ±0,32	11,05d ±1,09	11,81e ±1,20	9,41c ±0,61	9,02b ±0,25
Tasa Máxima de Crecimiento (div.día⁻¹)	1,14	1.05	0,99	1,06	0,81
Nitrógeno Residual (mM ± std)	1.19 ±0.12	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.83 ±0.38
Q_N celular (pg)	0,879a ±0.046	0,941ab ±0.04	1,057c ±0.10	1,003b ±0.15	0,958b ±0.041
Q_C celular (pg)	8,712a ±0,292	9,887ab ±0,109	11,064b ±1,22	10,041b ±1,01	9,894ab ±0,327
RelaciónC:N(átomos)	8,49a	9,01b	8,97ab	8,58ab	8,85ab
Absorción Atómica Si (fg.cél ⁻¹ ± std)	0,71 ±0,02	1,10 ±0,16	1,90 ±0,13	1,4 ±0,02	0,78 ±0,05

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 6
Cultivo en semicontinuo de *Isochrysis galbana* var T-iso + SELENIO
Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L
Tasa de renovación 30%.día⁻¹

	0 mM	0.1 mM	1.0 mM	10.0 mM	100.0 mM
Densidad celular (10 ⁶ cél.mL ⁻¹ ± std)	21,04a ±1,68	78,75bc ±6,46	85,50c ±7,28	75,80b ±4,49	MC*
Productividad (10 ⁹ céls.L ⁻¹ .día ⁻¹)	6,42	23,62	25,65	22,74	
% proteína en F.O.	30,09	24,31	33,25	36,05	-----
% carboh. en F.O.	48,29	37,56	42,75	42,49	-----
% lípidos en F.O.	21,61	38,13	23,99	21,46	-----
Proteína (pg.cél ⁻¹ ±std)	2,73a ±0.18	2,90b ±0.27	3,66c ±0.039	3,68c ±0,43	-----
Carbohidratos (pg.cél ⁻¹ ± std)	4,39a ±0.33	4,48b ±0.12	4,70c ±0.20	4,33a ±0.063	-----
Lípidos (pg.cél ⁻¹ ± std)	1,96a ±0.037	4,55d ±0.16	2,64c ±0.041	2,19b ±0.21	-----
Peso orgánico (pg.cél ⁻¹)	9,09	11,94	11.01	10,20	
Valor calórico (10 ⁻⁷ J.cél ⁻¹)	2.18	3.26	2.72	2.48	
Peso seco (µg.mL ⁻¹ ±std)	399,33 ±17,40	1646,50 ±127,21	1974,70 ±25,24	2012,37 ±29,79	
Peso seco (pg.cel ⁻¹ ±std)	10,74a ±0,81	14,64d ±1,16	13,95c ±1,29	13,07b ±1,42	
Cenizas (pg.cel ⁻¹ ±std)	1,66a ±0,15	2,70b ±0,12	2,94d ±0,18	2,87c ±0,31	
Materia Orgánica (pg.cel ⁻¹ ±std)	9,09a ±0,95	11,94d ±1,15	11,01c ±1,07	10,22b ±0,26	
Tasa Máxima Crecimiento (div.día ⁻¹)	1,29	0,93	0,82	1,39	-0,03
Nitrógeno Residual (mM ± std)	1.89 ±0.017	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	-----
Q_N celular (pg)	0,566a ±0.020	0,571ab ±0.012	0,617b ±0.027	0,594ab ±0.010	
Q_C celular (pg)	5,986ab ±0.106	5,981ab ±0.129	6,231b ±0.178	5,806a ±0.82	
RelaciónC.N(átomos)	9,07b	8,98ab	8,65ab	8,38a	
Absorción Atómica Se (fg.cél ⁻¹ ± std)	0,30 ±0.02	0,58 ±0.03	0,63 ±0.05	0,97 ±0.05	Toxicidad

MC*= Muerte celular. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0,05).

Tabla 7
Cultivo en semicontinuo de *Isochrysis galbana* var T-iso + HIERRO
Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L
Tasa de renovación 30%.día⁻¹

	0 mM	0.1 mM	1.0 mM	10.0mM	100.0 mM	20.0mM
Densidad celular (10⁶ cél.mL⁻¹ ±std)	7,76a ±0,19	8,83a ±0,41	72,51b ±1,20	82,62c ±3,41	79,38c ±3,24	99,11d ±3,50
Productividad (10⁹céls.L⁻¹.día⁻¹)	2,33	2,65	21,75	24,79	23,81	29,73
% proteína en F.O.	32,93	28,47	32,85	32,91	26,13	21,54
% carboh. en F.O.	36,53	33,84	31,42	32,46	51,54	40,48
% lípidos en F.O.	30,54	37,69	35,72	34,63	22,33	37,97
Proteína (pg.cél⁻¹ ± std)	1,93a ±0,054	4,03d ±0,069	4,13d ±0,30	3,83c ±0,17	1,99a ±0,17	2,17b ±0,24
Carbohidratos (pg.cél⁻¹ ± std)	2,14a ±0,25	4,79e ±0,20	3,95c ±0,33	3,78b ±0,26	3,93c ±0,25	4,08d ±0,069
Lípidos (pg.cél⁻¹ ± std)	1,79a ±0,17	5,34e ±0,12	4,49d ±0,13	4,03c ±0,35	1,70a ±0,13	3,83b ±0,14
Peso orgánico pg.cel⁻¹	5,86	14,17	12,57	11,64	7,62	10,08
Valor calórico (10⁻⁷ J.cél⁻¹)	1,53	3,90	3,44	3,16	1,82	2,73
Peso seco µg.mL⁻¹ ±std	147,5 ±11,17	175,07 ±2,84	1707,07 ±16,80	2386,50 ±75,36	2153,40 ±147,27	2584,56 ±176,10
Peso seco (pg.cel⁻¹ ±std)	6,90a ±0,44	16,96f ±1,32	15,71e ±1,23	15,03d ±1,18	10,22b ±0,91	13,35c ±1,51
Cenizas pg.cel⁻¹ ±std	1,04a ±0,12	2,79b ±0,26	3,14c ±0,29	3,39d ±0,26	2,60b ±0,25	3,27d ±0,16
Materia Orgánica pg.cel⁻¹ ±std	5.83a ±0,60	14.15f ±1,33	12,57e ±1,25	11,59d ±1,22	7,62b ±0,12	10,08c ±0,98
Nitrógeno Residual mM ± std	3,27 ±0.14	3,20 ±0,08	0,84 ±0.053	0,0 ±0.0	0.0 ±0.0	0,0 ±0.0
Tasa Máxima Crecimiento (div.día⁻¹)	0,95	1,34	1,52	1,51	1,02	0,97
Q_N celular (pg)	0,458a ±0.059	0,511a ±0.032	0,739b ±0.015	0,784bc ±0.02	0,776bc ±0,08	0,829c ±0.017
Q_C celular (pg)	4,291a ±0.087	4,594a ±0.240	6,601b ±0.068	7,021c ±0.055	6,968c ±0.152	7,439d ±0.095
RelaciónC:N(átomos)	8,04b	7,71ab	7,65a	7,67ab	7,69ab	7,69ab
Absorción Atómica Fe (fg.cél⁻¹ ± std)	0,79 ±0,03	1,10 ±0,135	3,20 ±0,26	3,1 ±0,15	13,01 ±1,19	6,00 ±0,25

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

Tabla 8
Cultivo en semicontinuo de *Isochrysis galbana* var T-iso + AZUFRE
Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L
Tasa de renovación 30%.día⁻¹

	0 mM	0.1 mM	1.0 mM	10.0 mM	100.0 mM
Densidad celular (10 ⁶ cél.mL ⁻¹ ± std)	48,31a ±4,11	100,33d ±5,86	89,17c ±3,56	88,88c ±3,35	76,27b ±5,70
Productividad (10 ⁹ céls.L ⁻¹ .día ⁻¹)	14,49	30,10	26,75	26,66	22,88
% proteína en F.O.	38,52	40,28	42,25	31,21	29,46
% carboh. en F.O.	36,09	32,33	32,22	39,13	43,56
% lípidos en F.O.	25,39	27,38	25,53	29,66	26,98
Proteína (pg.cél ⁻¹ ± std)	3,96c ±0,060	4,56d ±0,075	5,18e ±0,048	3,23b ±0,065	2,34a ±0,32
Carbohidratos (pg.cél ⁻¹ ± std)	3,71b ±0,086	3,66b ±0,053	3,95c ±0,067	4,05d ±0,093	3,46a ±0,17
Lípidos (pg.cél ⁻¹ ± std)	2,61b ±0,076	3,10c ±0,16	3,13c ±0,087	3,07c ±0,11	2,14a ±0,21
Peso orgánico (pg.cel ⁻¹)	10,28	11,32	12,26	10,35	7,94
Valor calórico (10 ⁻⁷ J.cél ⁻¹)	2,61	2,94	3,15	2,68	1,99
Peso seco. µg.mL ⁻¹ ±std	903.53 ±21,66	2020,13 ±24,67	2074,30 ±41,30	2377,43 ±24,34	2294,96 ±12,12
Peso seco (pg.cel ⁻¹) ±std	12,23b ±0,94	14,05d ±1,24	15,59e ±1,46	13,44c ±1,27	10,54a ±0,68
Cenizas (pg.cel ⁻¹ ±std)	1,95a ±0,13	2,73b ±0,179	3,33d ±0,183	3,09c ±0,26	2,59b ±0,32
Materia Orgánica (pg.cel ⁻¹ ± std)	10,27b ±0,69	11,32c ±1,28	12,23d ±0,941	10,35b ±1,27	7,94a ±0,59
Nitrógeno Residual mM ± std	0,03 ±0,001	0,07 ±0,004	0,06 ±0,001	0,03 ±0,0017	0,03 ±0,0018
Tasa Máxima Crecimiento (div.día ⁻¹)	0,86	0,79	1,13	1,00	1,07
Q_N celular (pg) ±0.017	0,734ab ±0.017	0,794c ±0.010	0,748b ±0.013	0,727ab ±0.024	0,700a ±0.013
Q_C celular (pg) ±0.196	6,310a ±0.196	6,980b ±0.107	6,700ab ±0.142	6,606ab ±0.183	6,517a ±0.119
RelaciónC:N(átomos)	7,37a	7,54ab	7,68ab	7,79ab	7,98b
Absorción Atómica S (pg.cél ⁻¹ ± std)	0,16 ±0,015	0,17 ±0,013	0,21 ±0,019	0,20 ±0,018	0,26 ±0,014

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 9
Cultivo en semicontinuo de *Isochrysis galbana* var T-iso + ZINC
Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L
Tasa de renovación 30%.día⁻¹

	0 mM	0.1 mM	1.0 mM	10.0 mM	100.0 mM
Densidad celular (10⁶ cél.mL⁻¹ std)	85,75 ab ±1,68	86,33 ab ±2,49	88,21 b ±5,57	84,33 ab ±1,34	3,36 a ±0,40
Productividad (10⁹ céls.L⁻¹.día⁻¹)	25,90	26,46	25,72	25,30	1,80
% proteína en F.O.	33,38	31,38	34,24	29,91	27,62,
% carboh. en F.O.	41,71	34,52	30,53	38,64	38,11
% lípidos en F.O.	24,86	34,09	35,23	31,45	34,26
Proteína (pg.cél⁻¹ ± std)	3,03 b ±0,22	3,12 b ±0,18	4,16 c ±0,16	3,12 b ±0,079	2,87 a ±0,059
Carbohidratos (pg.cél⁻¹ ± std)	3,79 b ±0,039	3,43 a ±0,039	3,71 b ±0,084	4,03 d ±0,11	3,96 c ±0,18
Lípidos (pg.cél⁻¹ ± std)	2,26 a ±0,082	3,39 c ±0,045	4,28 d ±0,11	3,28 b ±0,077	3,56 c ±0,83
Peso orgánico (pg.cel⁻¹)	9,08	9,94	12,15	10,43	10,39
Valor calórico (10⁻⁷ J.cél⁻¹)	2,26	2,67	3,32	2,73	2,77
Peso seco µg.mL⁻¹ ±std	1680,64 ±30,24	1859,83 ±167,97	1998,03 ±43,25	2135,70 ±35,54	96,17 ±8,86
Peso seco (pg.cel⁻¹) ±std	10,84 a ±0,59	12,14 b ±1,19	15,49 d ±1,50	13,51 c ±1,42	13,84 c ±0,64
Cenizas pg.cel⁻¹ ±std	1,76 a ±0,136	2,20 b ±0,11	3,34 d ±0,28	3,07 c ±0,41	3,44 d ±0,41
Materia Orgánica pg.cel⁻¹ ±std	9,08 a ±0,35	9,92 b ±0,20	12,14 d ±0,47	10,43 c ±0,93	10,39 c ±1,03
Nitrógeno Residual mM ± std	0,07 ±0,0005	0,04 ±0,001	0,04 ±0,001	0,01 ±0,0001	3,13 ±0,20
Tasa Máxima Crecimiento (div.día⁻¹)	1,21	1,16	1,72	1,44	1,23
Q_N celular (pg)	0,743 c ±0,013	0,763 c ±0,032	0,799 d ±0,010	0,696 b ±0,034	0,426 a ±0,022
Q_C celular (pg)	7,045 b ±0,197	7,216 c ±0,220	7,512 d ±0,86	7,054 b ±0,96	6,116 a ±0,509
RelaciónC:N(átomos)	8,13 ab	8,06 a	8,10 ab	8,68 ab	12,30 b
Absorción Atómica Zinc(fg.cél⁻¹ ±std)	2,00 ±0,23	2,21 ±0,17	2,96 ±0,19	3,52 ±0,29	180,0 ±8,12

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 10
Cultivo en semicontinuo de *Isochrysis galbana* var T-iso + COBRE
Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L
Tasa de renovación 30%.día⁻¹

	0 mM	0.1 mM	1.0 mM	10.0 mM	100.0 mM
Densidad celular (10 ⁶ cél.mL ⁻¹ std)	79,87a ±5,96	81,31a ±6,01	95,21b ±5,24	88,34ab ±8,01	----
Productividad (10 ⁹ céls.L ⁻¹ .día ⁻¹)	23,96	24,39	28,56	26,50	----
% proteína en F.O.	35,75	31,48	34,81	36,80	----
% carboh. en F.O.	42,24	46,74	34,47	37,80	----
% lípidos en F.O.	22,02	21,78	30,71	24,40	----
Proteína (pg.cél ⁻¹ ± std)	3,16a ±0,096	3,18ab ±0,089	3,99c ±0,154	3,69bc ±0,086	----
Carbohidratos (pg.cél ⁻¹ ± std)	3,73a ±0,12	4,72c ±0,26	3,95b ±0,25	3,79a ±0,075	----
Lípidos (pg.cél ⁻¹ ± std)	1,95a ±0,091	2,20b ±0,18	3,52c ±0,080	2,55b ±0,079	----
Peso orgánico (pg.cél ⁻¹)	8,85	10,10	11,46	10,03	----
Valor calórico (10 ⁻⁷ J.cél ⁻¹)	2,16	2,43	3,02	2,53	----
Peso seco µg.mL ⁻¹ ±std	1464,4 ±30,75	1585,67 ±30,09	2171,63 ±46,74	2281,50 ±106,45	----
Peso seco (pg.cél ⁻¹ ±std)	10,37a ±0,99	12,26b ±1,37	14,48d ±1,49	13,25c ±1,12	----
Cenizas (pg.cél ⁻¹ ±std)	1,52a ±0,13	2,16b ±0,24	3,02c ±0,24	3,22d ±0,48	----
Materia Orgánica (pg.cél ⁻¹ ±std)	8,85a ±1,14	10,10b ±1,25	11,46c ±1,15	10,03b ±0,59	----
Nitrógeno Residual mM ± std	0,14 ±0,00	0,06 ±0,00	0,04 ±0,00	0,04 ±0,00	----
Tasa Máxima Crecimiento (div.día ⁻¹)	1,14	1,35	1,49	1,02	-0.42
Q _N celular (pg)	0,757a ±0,013	0,789ab ±0,07	0,821b ±0,03	0,766a ±0,020	
Q _C celular (pg)	7,016a ±0,102	7,150ab ±0,70	7,316b ±0,51	6,949a ±0,155	
RelaciónC:N(átomos)	7,94b	7,77ab	7,64a	7,78ab	----
Absorción Atómica Cu (fg.cél ⁻¹ ± std)	0,092 ±0,005	0,096 ±0,001	0,11 ±0,015	0,37 ±0,02	

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 11
Coeficientes de Correlación r^2 en *Isochrysis galbana* var. T-iso

	Elementos							
	Fe^{3+}	S^{2-}	Zn^{2+}	Cu^{2+}	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Si^{4+}	Se^{2-}
Densidad celular (10^6 cél.mL$^{-1}$ \pm std) CD	0,93	0,94	0,91	0,99	0,77	0,75	0,92	0,95
Densidad celular (10^6 cél.mL$^{-1}$ \pm std) CS	0,87	0,75	0,89	0,63	0,78	0,68	0,65	0,98
Proteína (pg.célula$^{-1}$ \pm std) CS	0,66	0,53	0,95	0,99	0,96	0,82	0,40	0,98
Carbohidratos (pg.célula$^{-1}$ \pm std) CS	0,78	0,92	0,82	0,95	0,46	0,56	0,71	0,68
Lípidos (pg.célula$^{-1}$ \pm std) CS	0,46	0,91	0,85	0,99	0,98	0,74	0,61	0,51
Peso seco (pg.cel$^{-1}$ \pm std) CS	0,96	0,98	0,98	0,97	0,95	0,99	0,94	0,99
Cenizas pg.cel$^{-1}$ \pm std CS	0,97	0,97	0,96	0,95	0,93	0,97	0,92	0,99
Matéria Orgánica pg.cel$^{-1}$ \pm std. CS	0,89	0,98	0,81	0,90	0,95	0,97	0,91	0,97
Absorción Atómica (pg, fg.célula$^{-1}$ \pm std) CS	0,96	0,88	0,86	0,95	0,94	0,93	0,79	0,94
% DHA vs [elemento]	0,80	0,77	0,95	0,55	0,92	0,93	0,60	0,80
% Ácidos Grasos Sat+Monoinsaturados	0,72	0,97	0,41	0,70	0,55	0,86	0,70	0,78
% Ácidos Grasos Poliinsaturados	0,75	0,97	0,46	0,73	0,60	0,93	0,74	0,78
% ω-3/ω-6 vs [elemento]	0,90	0,97	0,97	0,77	0,83	0,86	0,31	0,91
%DHA:EPA vs [elemento]	0,90	0,67	0,96	0,53	0,58	0,90	0,66	0,92
%DHA:ARA vs [elemento]	0,90	0,63	0,96	0,85	0,92	0,80	0,62	0,76

Tabla 12. Composición de Ácidos Grasos (% del total A.G.), ácidos grasos x célula (A.G. pg.cél⁻¹) y lípidos totales x célula (pg.cél⁻¹) en *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes concentraciones **mM de Magnesio**.

[0]															[0,1]			[1,0]			[10,0]			[100,0]																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Acido Graso																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A

A.G. ácido graso, DHA, docosaexaenolico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0,05).

Tabla 13. Composición de Ácidos Grasos (% del total A.G.), ácidos grasos x célula (A.G. pg.cél⁻¹) y lípidos totales x célula (pg.cél⁻¹) en *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes concentraciones mM de Calcio.

Acido Graso	[0]			[0,1]			[1,0]			[10,0]			[100,0]		
	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	
12:0	0.21±0.01	0.001±0.000	1.08±0.16	1.08±0.001	0.009±0.001	1.36±0.18	0.012±0.001	0.012±0.001	0.24±0.02	0.002±0.000	0.34±0.00	0.003±0.000	0.003±0.000		
14:0	20.45±0.29	0.130±0.016	27.93±2.50	0.284±0.013	0.284±0.013	31.54±3.37	0.270±0.010	0.270±0.010	27.33±2.14	0.238±0.029	33.09±3.06	0.265±0.026	0.265±0.026		
15:0	1.10±0.03	0.007±0.000	1.06±0.15	0.010±0.002	0.010±0.002	1.06±0.14	0.009±0.000	0.009±0.000	0.91±0.03	0.008±0.000	0.96±0.01	0.008±0.000	0.008±0.000		
16:0	29.00±1.75	0.179±0.013	27.68±1.72	0.278±0.026	0.278±0.026	29.42±2.44	0.247±0.027	0.247±0.027	25.08±0.62	0.213±0.024	22.57±1.20	0.178±0.017	0.178±0.017		
16:1(n-7)	8.77±0.36	0.053±0.007	6.56±0.48	0.064±0.008	0.064±0.008	5.43±0.57	0.043±0.004	0.043±0.004	7.28±0.79	0.060±0.006	5.82±0.05	0.046±0.006	0.046±0.006		
16:2(n-6)	0.30±0.01	0.002±0.000	0.16±0.017	0.001±0.000	0.001±0.000	0.16±0.01	0.001±0.000	0.001±0.000	0.18±0.018	0.001±0.000	0.11±0.01	0.0008±0.00	0.0008±0.00		
16:2(n-4)	0.79±0.03	0.005±0.000	0.38±0.02	0.004±0.000	0.004±0.000	0.31±0.02	0.002±0.000	0.002±0.000	0.47±0.02	0.004±0.000	0.31±0.03	0.002±0.000	0.002±0.000		
18:0	1.04±0.15	0.006±0.000	0.76±0.04	0.007±0.000	0.007±0.000	3.53±0.22	0.032±0.002	0.032±0.002	0.82±0.03	0.007±0.000	0.54±0.08	0.004±0.000	0.004±0.000		
18:1(n-9)	23.95±2.05	0.146±0.010	22.62±2.04	0.226±0.024	0.226±0.024	19.30±0.10	0.156±0.013	0.156±0.013	22.78±0.89	0.192±0.013	22.47±1.30	0.179±0.013	0.179±0.013		
18:1(n-7)	0.55±0.032	0.003±0.000	1.02±0.14	0.010±0.001	0.010±0.001	0.77±0.03	0.006±0.000	0.006±0.000	1.63±0.10	0.013±0.001	1.37±0.13	0.011±0.001	0.011±0.001		
18:2(n-6)	1.92±0.16	0.011±0.001	1.57±0.18	0.015±0.001	0.015±0.001	1.08±0.15	0.008±0.000	0.008±0.000	2.26±0.27	0.017±0.001	1.32±0.16	0.010±0.001	0.010±0.001		
18:3(n-6)	0.07±0.00	0.0004±0.00	0.05±0.00	0.0005±0.00	0.0005±0.00	0.03±0.00	0.0002±0.00	0.0002±0.00	0.08±0.01	0.0006±0.00	0.04±0.00	0.0003±0.00	0.0003±0.00		
18:3(n-3)	1.54±0.14	0.009±0.000	1.18±0.15	0.011±0.001	0.011±0.001	0.95±0.04	0.007±0.000	0.007±0.000	1.57±0.16	0.013±0.001	1.17±0.15	0.009±0.000	0.009±0.000		
18:4(n-3)	3.23±0.30	0.020±0.001	2.13±0.18	0.020±0.002	0.020±0.002	1.51±0.16	0.012±0.000	0.012±0.000	2.71±0.26	0.022±0.002	2.42±0.26	0.019±0.002	0.019±0.002		
20:0	0.25±0.02	0.001±0.000	0.20±0.02	0.002±0.000	0.002±0.000	0.17±0.002	0.001±0.000	0.001±0.000	0.33±0.01	0.003±0.000	0.34±0.01	0.003±0.000	0.003±0.000		
20:1(n-9)	0.11±0.02	0.0006±0.00	0.65±0.08	0.006±0.000	0.006±0.000	0.12±0.014	0.001±0.000	0.001±0.000	0.15±0.01	0.0013±0.00	0.10±0.01	0.0008±0.00	0.0008±0.00		
20:2(n-9)	0.07±0.00	0.0004±0.00	0.16±0.02	0.002±0.000	0.002±0.000	0.23±0.035	0.002±0.000	0.002±0.000	0.27±0.02	0.0023±0.00	0.22±0.01	0.002±0.000	0.002±0.000		
20:3(n-5)	0.07±0.00	0.0004±0.00	0.04±0.00	0.0004±0.00	0.0004±0.00	0.03±0.00	0.0003±0.00	0.0003±0.00	0.04±0.00	0.0004±0.00	0.04±0.00	0.0003±0.00	0.0003±0.00		
20:4(n-6)	0.68±0.03	0.004±0.000	1.18±0.18	0.011±0.001	0.011±0.001	0.93±0.03	0.008±0.000	0.008±0.000	1.00±0.12	0.008±0.000	0.72±0.01	0.006±0.000	0.006±0.000		
20:5(n-3)	0.73±0.04	0.004±0.000	0.76±0.01	0.008±0.000	0.008±0.000	0.78±0.04	0.006±0.000	0.006±0.000	0.80±0.02	0.007±0.000	0.84±0.00	0.007±0.000	0.007±0.000		
22:0	0.22±0.02	0.001±0.000	0.13±0.02	0.001±0.000	0.001±0.000	0.17±0.01	0.001±0.000	0.001±0.000	0.18±0.01	0.002±0.000	0.18±0.01	0.001±0.000	0.001±0.000		
22:1	0.43±0.05	0.003±0.000	0.81±0.08	0.008±0.000	0.008±0.000	0.75±0.04	0.007±0.000	0.007±0.000	0.81±0.04	0.007±0.000	0.57±0.07	0.004±0.000	0.004±0.000		
22:5	0.94±0.02	0.006±0.000	0.58±0.06	0.006±0.000	0.006±0.000	0.46±0.02	0.004±0.000	0.004±0.000	0.71±0.03	0.006±0.000	0.98±0.00	0.008±0.000	0.008±0.000		
22:6(n-3)	2.64±0.24	0.024±0.002	3.81±0.16	0.028±0.002	0.028±0.002	3.92±0.08	0.034±0.000	0.034±0.000	2.60±0.10	0.023±0.001	3.83±0.04	0.030±0.003	0.030±0.003		
Saturados	52.26±5.83	0.327±0.038	56.50±4.84	0.591±0.02	0.591±0.02	67.25±1.32	0.689±0.069	0.689±0.069	54.89±6.25	0.472±0.014	58.02±2.06	0.461±0.080	0.461±0.080		
Monounsaturados	33.81±3.4a	0.206±0.015	31.66±3.3c	0.314±0.036	0.314±0.036	26.36±2.7d	0.228±0.025	0.228±0.025	32.65±3.1b	0.273±0.030	30.33±0.2c	0.240±0.036	0.240±0.036		
Poliinsaturados	14.14±1.4d	0.087±0.002	12.29±0.7b	0.102±0.015	0.102±0.015	7.74±0.9a	0.071±0.001	0.071±0.001	12.70±1.1c	0.105±0.008	11.99±1.2b	0.093±0.002	0.093±0.002		
ω-3	9.98±0.89	0.062±0.002	8.75±0.17	0.074±0.007	0.074±0.007	5.44±0.59	0.044±0.001	0.044±0.001	8.69±0.27	0.073±0.012	8.97±0.27	0.070±0.001	0.070±0.001		
ω-6	2.29±0.28	0.014±0.001	2.30±0.34	0.017±0.001	0.017±0.001	1.27±0.16	0.010±0.001	0.010±0.001	2.51±0.28	0.019±0.001	1.46±0.17	0.011±0.001	0.011±0.001		
ω-3/ω-6	4.36±0.3d	4.36±0.38	3.80±0.3b	3.80±0.38	3.80±0.38	4.28±0.4c	4.28±0.49	4.28±0.49	3.46±0.3a	3.46±0.26	6.14±0.6e	6.14±0.69	6.14±0.69		
DHA	2.64±0.2a	0.024±0.002	3.81±0.2b	0.028±0.003	0.028±0.003	3.92±0.1c	0.034±0.00	0.034±0.00	2.60±0.1a	0.023±0.001	3.83±0.4b	0.030±0.005	0.030±0.005		
DHA/EPA	3.18±0.3a	3.18±0.36	4.24±0.5b	4.24±0.36	4.24±0.36	5.00±0.1d	5.00±0.14	5.00±0.14	3.19±0.3a	3.19±0.38	4.57±0.1c	4.57±0.08	4.57±0.08		
DHA/ARA	3.88±0.2c	3.88±0.2b	3.23±0.2b	3.23±0.2b	3.23±0.2b	4.21±0.3d	4.21±0.3d	4.21±0.3d	2.60±0.2a	2.60±0.2a	5.32±0.4e	5.32±0.4e	5.32±0.4e		
EPA/ARA	1.07±0.1c	1.07±0.1c	0.64±0.0a	0.64±0.0a	0.64±0.0a	0.84±0.0b	0.84±0.0b	0.84±0.0b	0.80±0.0b	0.80±0.0b	1.16±0.1d	1.16±0.1d	1.16±0.1d		
Total A.G.	±	0.618±0.06a	±	0.998±0.02e	±	0.998±0.04d	±	0.988±0.04d	±	0.848±0.01c	±	0.792±0.01b	0.792±0.01b		
Total Lípidos	±	2.52±0.17	±	3.53±0.11	±	2.63±0.12	±	2.63±0.12	±	2.81±0.18	±	1.56±0.18	1.56±0.18		

A.G.: ácido graso, DHA, docosahexaenoico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0.05).

A.G. ácido graso, DHA, docosaenoico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0,05).

Tabla 14. Composición de Ácidos Grasos (% del total A.G.), ácidos grasos x célula (A.G. pg.cél⁻¹) y lípidos totales x célula (pg.cél⁻¹) en *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes concentraciones **mM de Silicio**. A.G. ácido graso, DHA, docosaenoico. Los valores son la media ± SD (n=3)

Acido Graso	[0]			[0,1]			[1,0]			[10,0]			[100,0]		
	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	pg.cél ⁻¹
12:0	0.10±0.01	0.0006±0.00	0.07±0.00	0.12±0.02	0.0004±0.00	0.12±0.02	0.12±0.02	0.001±0.00	0.03±0.01	0.0002±0.00	0.0002±0.00	0.03±0.01	0.0025±0.00	0.0025±0.00	0.0025±0.00
14:0	24.97±1.43	0.145±0.008	22.27±2.85	23.44±2.05	0.138±0.013	23.44±2.05	23.44±2.05	0.225±0.025	17.42±1.54	0.090±0.002	0.090±0.002	22.59±1.87	0.114±0.010	0.114±0.010	0.114±0.010
15:0	0.73±0.06	0.004±0.00	0.59±0.04	0.59±0.04	0.004±0.00	0.59±0.04	0.59±0.04	0.006±0.00	0.65±0.02	0.0033±0.00	0.0033±0.00	0.53±0.03	0.003±0.00	0.003±0.00	0.003±0.00
16:0	25.11±1.08	0.146±0.006	24.48±2.99	20.07±1.12	0.152±0.035	20.07±1.12	20.07±1.12	0.190±0.010	22.25±2.68	0.114±0.018	0.114±0.018	30.21±0.50	0.153±0.024	0.153±0.024	0.153±0.024
16:1(n-7)	7.04±0.14	0.041±0.001	5.88±0.15	7.89±0.59	0.036±0.007	7.89±0.59	7.89±0.59	0.072±0.006	5.62±0.47	0.029±0.001	0.029±0.001	4.72±0.89	0.023±0.000	0.023±0.000	0.023±0.000
16:2(n-6)	0.09±0.00	0.0005±0.00	0.14±0.01	0.14±0.01	0.0009±0.00	0.14±0.01	0.14±0.01	0.0012±0.00	0.19±0.01	0.001±0.00	0.001±0.00	0.15±0.01	0.0007±0.00	0.0007±0.00	0.0007±0.00
16:2(n-4)	0.45±0.07	0.003±0.00	1.02±0.10	0.37±0.02	0.006±0.00	0.37±0.02	0.37±0.02	0.0035±0.00	0.66±0.01	0.0034±0.00	0.0034±0.00	0.24±0.03	0.0012±0.00	0.0012±0.00	0.0012±0.00
18:0	1.43±0.13	0.008±0.00	1.43±0.10	1.50±0.19	0.008±0.00	1.50±0.19	1.50±0.19	0.014±0.001	7.26±0.19	0.037±0.002	0.037±0.002	6.41±0.67	0.035±0.003	0.035±0.003	0.035±0.003
18:1(n-9)	25.80±0.57	0.150±0.003	29.58±2.19	29.65±1.63	0.184±0.014	29.65±1.63	29.65±1.63	0.295±0.015	27.31±1.95	0.140±0.012	0.140±0.012	26.69±2.59	0.134±0.010	0.134±0.010	0.134±0.010
18:1(n-7)	3.87±0.12	0.022±0.001	3.94±0.10	4.58±0.22	0.024±0.002	4.58±0.22	4.58±0.22	0.042±0.001	1.13±0.13	0.006±0.00	0.006±0.00	1.38±0.17	0.007±0.000	0.007±0.000	0.007±0.000
18:2(n-6)	2.76±0.12	0.016±0.001	3.16±0.28	3.03±0.39	0.019±0.001	3.03±0.39	3.03±0.39	0.029±0.002	5.73±0.78	0.029±0.001	0.029±0.001	2.06±0.10	0.010±0.001	0.010±0.001	0.010±0.001
18:3(n-6)	0.14±0.02	0.0008±0.00	0.13±0.01	0.15±0.01	0.0008±0.00	0.13±0.01	0.15±0.01	0.0014±0.00	0.23±0.01	0.0012±0.00	0.0012±0.00	0.06±0.00	0.0003±0.00	0.0003±0.00	0.0003±0.00
18:3(n-3)	1.37±0.12	0.008±0.00	1.47±0.15	1.50±0.12	0.009±0.00	1.47±0.15	1.50±0.12	0.014±0.001	2.52±0.29	0.013±0.005	0.013±0.005	0.72±0.07	0.004±0.000	0.004±0.000	0.004±0.000
18:4(n-3)	1.55±0.18	0.009±0.00	1.54±0.16	2.04±0.25	0.009±0.00	1.54±0.16	2.04±0.25	0.019±0.001	3.85±0.36	0.020±0.002	0.020±0.002	1.16±0.08	0.006±0.000	0.006±0.000	0.006±0.000
20:0	0.42±0.05	0.0024±0.00	0.41±0.02	0.41±0.05	0.0024±0.00	0.41±0.02	0.41±0.05	0.004±0.00	0.33±0.01	0.002±0.00	0.002±0.00	0.16±0.02	0.0008±0.00	0.0008±0.00	0.0008±0.00
20:1(n-9)	0.14±0.02	0.0008±0.00	0.15±0.01	0.34±0.03	0.0009±0.00	0.15±0.01	0.34±0.03	0.003±0.00	0.16±0.02	0.0008±0.00	0.0008±0.00	0.09±0.00	0.0005±0.00	0.0005±0.00	0.0005±0.00
20:2(n-9)	0.55±0.04	0.0032±0.00	0.31±0.01	0.44±0.03	0.002±0.00	0.31±0.01	0.44±0.03	0.004±0.00	0.24±0.01	0.0013±0.00	0.0013±0.00	0.22±0.03	0.001±0.000	0.001±0.000	0.001±0.000
20:3(n-5)	0.17±0.02	0.001±0.00	0.70±0.02	0.36±0.04	0.0042±0.00	0.36±0.04	0.36±0.04	0.004±0.00	0.45±0.09	0.0023±0.00	0.0023±0.00	0.06±0.00	0.0003±0.00	0.0003±0.00	0.0003±0.00
20:4(n-6)	0.06±0.00	0.0004±0.00	0.10±0.02	0.07±0.00	0.0006±0.00	0.10±0.02	0.07±0.00	0.0006±0.00	0.07±0.01	0.0004±0.00	0.0004±0.00	0.05±0.00	0.0007±0.00	0.0007±0.00	0.0007±0.00
20:4(n-3)	0.38±0.01	0.0022±0.00	0.33±0.01	0.54±0.02	0.002±0.00	0.33±0.01	0.54±0.02	0.005±0.00	0.30±0.01	0.0015±0.00	0.0015±0.00	0.15±0.02	0.0007±0.00	0.0007±0.00	0.0007±0.00
20:5(n-3)	0.65±0.02	0.004±0.00	0.62±0.03	0.79±0.02	0.004±0.00	0.62±0.03	0.79±0.02	0.008±0.00	0.69±0.02	0.004±0.00	0.004±0.00	0.38±0.03	0.002±0.00	0.002±0.00	0.002±0.00
22:0	0.09±0.06	0.0005±0.00	0.14±0.02	0.17±0.02	0.0009±0.00	0.14±0.02	0.17±0.02	0.002±0.00	0.24±0.02	0.0012±0.00	0.0012±0.00	0.13±0.02	0.0007±0.00	0.0007±0.00	0.0007±0.00
22:1	0.63±0.03	0.004±0.00	0.55±0.06	0.74±0.02	0.0035±0.00	0.55±0.06	0.74±0.02	0.007±0.00	0.33±0.02	0.002±0.00	0.002±0.00	0.42±0.01	0.0021±0.00	0.0021±0.00	0.0021±0.00
22:5	0.11±0.01	0.0007±0.00	0.23±0.02	0.18±0.01	0.0014±0.00	0.23±0.02	0.18±0.01	0.002±0.00	0.50±0.02	0.0026±0.00	0.0026±0.00	0.22±0.01	0.001±0.000	0.001±0.000	0.001±0.000
22:6(n-3)	0.46±0.02	0.003±0.00	0.78±0.02	0.91±0.02	0.005±0.00	0.78±0.02	0.91±0.02	0.009±0.00	0.84±0.16	0.009±0.00	0.009±0.00	0.76±0.03	0.004±0.000	0.004±0.000	0.004±0.000
Saturados	52.84±2.13	0.306±0.012	49.39±4.96	46.30±4.03	0.306±0.030	49.39±4.96	46.30±4.03	0.441±0.013	48.18±4.98	0.248±0.030	0.248±0.030	60.49±5.17	0.309±0.040	0.309±0.040	0.309±0.040
Monounsaturados	37.34±0.3c	0.217±0.002	40.11±2.3b	43.20±4.0b	0.249±0.025	40.11±2.3b	43.20±4.0b	0.419±0.014	34.55±2.3a	0.177±0.013	0.177±0.013	33.31±3.1d	0.166±0.010	0.166±0.010	0.166±0.010
Poliinsaturados	8.76±0.88b	0.051±0.005	10.51±1.5c	10.51±0.7c	0.064±0.002	10.51±1.5c	10.51±0.7c	0.0998±0.00	17.27±1.90d	0.089±0.003	0.089±0.003	6.21±0.11a	0.031±0.002	0.031±0.002	0.031±0.002
ω -3	4.41±0.06	0.026±0.002	4.73±0.08	5.78±0.16	0.029±0.005	4.73±0.08	5.78±0.16	0.054±0.004	9.20±0.46	0.047±0.002	0.047±0.002	3.17±0.29	0.016±0.001	0.016±0.001	0.016±0.001
ω -6	3.05±0.02	0.018±0.001	3.53±0.29	3.38±0.26	0.021±0.005	3.53±0.29	3.38±0.26	0.033±0.009	6.22±0.69	0.032±0.001	0.032±0.001	2.30±0.13	0.012±0.001	0.012±0.001	0.012±0.001
ω -3/ω -6	1.44±0.1b	1.442±0.120	1.34±0.1a	1.71±0.1c	1.34±0.06	1.34±0.1a	1.71±0.1c	1.71±0.14	1.48±0.1b	1.48±0.12	1.48±0.12	1.38±0.2a	1.38±0.120	1.38±0.120	1.38±0.120
DHA	0.46±0.0a	0.003±0.00	0.78±0.0b	0.91±0.0b	0.005±0.00	0.78±0.0b	0.91±0.0b	0.009±0.00	0.84±0.0c	0.009±0.00	0.009±0.00	0.76±0.0b	0.004±0.000	0.004±0.000	0.004±0.000
DHA/EPA	0.70±0.0a	0.702±0.063	2.01±0.2d	1.17±0.1b	2.01±0.27	2.01±0.2d	1.17±0.1b	1.17±0.13	1.22±0.1c	1.22±0.24	1.22±0.24	2.01±0.2d	2.01±0.25	2.01±0.25	2.01±0.25
DHA/ARA	7.67±0.53a	7.80±0.39b	7.80±0.39b	13.00±1.10d	7.80±0.39b	7.80±0.39b	13.00±1.10d	12.00±1.13c	12.00±1.13c	15.20±1.23e	15.20±1.23e	7.60±0.49b	7.60±0.49b	7.60±0.49b	7.60±0.49b
EPA/ARA	10.83±0.98d	6.20±0.37a	6.20±0.37a	11.28±0.99e	6.20±0.37a	6.20±0.37a	11.28±0.99e	9.86±0.79c	9.86±0.79c	0.514±0.03a	0.514±0.03a	±	±	±	±
Total A.G.	±	0.575±0.01b	±	0.619±0.01c	±	0.619±0.01c	±	0.960±0.02d	±	0.960±0.02d	±	0.514±0.03a	±	0.507±0.04a	0.507±0.04a
Total Lípidos	±	1.41±0.12	±	3.99±0.13	±	3.99±0.13	±	1.69±0.11	±	1.69±0.11	±	2.72±0.10	±	2.71±0.15	2.71±0.15

Tabla 15. Composición de Ácidos Grasos (% del total A.G.), ácidos grasos x célula (A.G. pg.cél⁻¹) y lípidos totales x célula (pg.cél⁻¹) en *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes concentraciones mM de Selenio.

Acido Graso	[0]			[0,1]			[1,0]			[10,0]			[100,0]		
	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.
12:0	0.20±0.03	0.002±0.000	0.04±0.00	0.005±0.00	0.0005±0.00	0.08±0.00	0.0008±0.00	0.0008±0.00	0.18±0.02	0.002±0.000	0.002±0.000	0.18±0.02	0.002±0.000	0.002±0.000	0.18±0.02
14:0	11.06±1.20	0.119±0.015	12.14±1.62	0.138±0.015	0.138±0.015	15.84±1.53	0.155±0.014	0.155±0.014	16.22±0.70	0.145±0.002	0.145±0.002	16.22±0.70	0.145±0.002	0.145±0.002	16.22±0.70
15:0	0.59±0.03	0.006±0.000	0.60±0.07	0.007±0.001	0.007±0.001	0.71±0.07	0.007±0.000	0.007±0.000	0.90±0.01	0.008±0.000	0.008±0.000	0.90±0.01	0.008±0.000	0.008±0.000	0.90±0.01
16:0	21.19±2.00	0.221±0.014	18.36±1.38	0.208±0.033	0.208±0.033	22.24±2.45	0.215±0.024	0.215±0.024	19.98±1.20	0.179±0.007	0.179±0.007	19.98±1.20	0.179±0.007	0.179±0.007	19.98±1.20
16:1(n-7)	5.24±0.19	0.056±0.002	5.91±0.39	0.067±0.003	0.067±0.003	6.61±0.28	0.064±0.001	0.064±0.001	7.87±0.72	0.070±0.007	0.070±0.007	7.87±0.72	0.070±0.007	0.070±0.007	7.87±0.72
16:2(n-6)	0.21±0.01	0.002±0.000	0.19±0.02	0.002±0.000	0.002±0.000	0.24±0.02	0.0023±0.00	0.0023±0.00	0.26±0.02	0.002±0.000	0.002±0.000	0.26±0.02	0.002±0.000	0.002±0.000	0.26±0.02
16:2(n-4)	0.20±0.01	0.002±0.000	0.67±0.03	0.008±0.000	0.008±0.000	0.65±0.01	0.0063±0.00	0.0063±0.00	0.83±0.01	0.007±0.000	0.007±0.000	0.83±0.01	0.007±0.000	0.007±0.000	0.83±0.01
18:0	34.69±3.37	0.034±0.002	4.89±0.16	0.055±0.004	0.055±0.004	6.31±0.22	0.057±0.003	0.057±0.003	0.21±0.02	0.002±0.000	0.002±0.000	0.21±0.02	0.002±0.000	0.002±0.000	0.21±0.02
18:1(n-9)	3.45±0.39	0.034±0.002	32.15±3.25	0.366±0.037	0.366±0.037	25.08±1.98	0.245±0.025	0.245±0.025	32.42±1.16	0.290±0.019	0.290±0.019	32.42±1.16	0.290±0.019	0.290±0.019	32.42±1.16
18:1(n-7)	4.19±0.42	0.044±0.007	0.41±0.06	0.005±0.000	0.005±0.000	0.75±0.03	0.0074±0.00	0.0074±0.00	1.62±0.13	0.015±0.003	0.015±0.003	1.62±0.13	0.015±0.003	0.015±0.003	1.62±0.13
18:2(n-6)	5.33±0.44	0.056±0.001	5.03±0.55	0.057±0.002	0.057±0.002	4.71±0.47	0.046±0.020	0.046±0.020	5.16±0.71	0.046±0.004	0.046±0.004	5.16±0.71	0.046±0.004	0.046±0.004	5.16±0.71
18:3(n-6)	0.27±0.02	0.003±0.000	0.26±0.01	0.003±0.000	0.003±0.000	0.26±0.01	0.0025±0.00	0.0025±0.00	0.24±0.02	0.002±0.000	0.002±0.000	0.24±0.02	0.002±0.000	0.002±0.000	0.24±0.02
18:3(n-3)	2.47±0.35	0.026±0.007	3.06±0.37	0.035±0.001	0.035±0.001	2.66±0.28	0.026±0.010	0.026±0.010	2.64±0.23	0.024±0.003	0.024±0.003	2.64±0.23	0.024±0.003	0.024±0.003	2.64±0.23
18:4(n-3)	3.11±0.36	0.033±0.001	6.27±0.41	0.071±0.002	0.071±0.002	5.67±0.72	0.055±0.002	0.055±0.002	4.14±0.26	0.037±0.003	0.037±0.003	4.14±0.26	0.037±0.003	0.037±0.003	4.14±0.26
20:0	0.66±0.01	0.007±0.000	0.47±0.02	0.005±0.000	0.005±0.000	0.44±0.02	0.0043±0.00	0.0043±0.00	0.42±0.05	0.004±0.000	0.004±0.000	0.42±0.05	0.004±0.000	0.004±0.000	0.42±0.05
20:1(n-9)	0.37±0.03	0.004±0.000	0.09±0.00	0.001±0.000	0.001±0.000	0.12±0.01	0.0012±0.00	0.0012±0.00	0.31±0.04	0.003±0.000	0.003±0.000	0.31±0.04	0.003±0.000	0.003±0.000	0.31±0.04
20:2(n-9)	0.54±0.05	0.006±0.000	0.22±0.01	0.0025±0.00	0.0025±0.00	0.32±0.01	0.0032±0.00	0.0032±0.00	0.51±0.02	0.005±0.000	0.005±0.000	0.51±0.02	0.005±0.000	0.005±0.000	0.51±0.02
20:3(n-5)	1.14±0.14	0.011±0.001	0.18±0.02	0.002±0.000	0.002±0.000	1.11±0.15	0.011±0.001	0.011±0.001	0.92±0.02	0.008±0.000	0.008±0.000	0.92±0.02	0.008±0.000	0.008±0.000	0.92±0.02
20:4(n-6)	0.63±0.01	0.0064±0.000	0.65±0.04	0.0074±0.00	0.0074±0.00	0.10±0.03	0.0013±0.00	0.0013±0.00	0.10±0.02	0.001±0.000	0.001±0.000	0.10±0.02	0.001±0.000	0.001±0.000	0.10±0.02
20:4(n-3)	0.76±0.05	0.008±0.000	0.34±0.02	0.004±0.000	0.004±0.000	0.27±0.02	0.003±0.001	0.003±0.001	0.41±0.05	0.004±0.000	0.004±0.000	0.41±0.05	0.004±0.000	0.004±0.000	0.41±0.05
20:5(n-3)	0.33±0.03	0.0034±0.000	0.42±0.05	0.0048±0.00	0.0048±0.00	0.54±0.01	0.005±0.001	0.005±0.001	0.74±0.01	0.007±0.000	0.007±0.000	0.74±0.01	0.007±0.000	0.007±0.000	0.74±0.01
22:0	0.98±0.31	0.010±0.001	0.34±0.01	0.004±0.000	0.004±0.000	0.61±0.03	0.006±0.000	0.006±0.000	0.52±0.06	0.005±0.000	0.005±0.000	0.52±0.06	0.005±0.000	0.005±0.000	0.52±0.06
22:1	0.59±0.03	0.006±0.000	1.30±0.07	0.015±0.001	0.015±0.001	0.86±0.02	0.008±0.000	0.008±0.000	0.86±0.03	0.008±0.000	0.008±0.000	0.86±0.03	0.008±0.000	0.008±0.000	0.86±0.03
22:5	1.62±0.14	0.017±0.004	5.36±0.14	0.061±0.002	0.061±0.002	3.51±0.15	0.033±0.006	0.033±0.006	1.99±0.07	0.005±0.000	0.005±0.000	1.99±0.07	0.005±0.000	0.005±0.000	1.99±0.07
22:6(n-3)	16.28±1.89	0.172±0.014	18.56±1.50	0.210±0.026	0.210±0.026	23.71±2.79	0.227±0.008	0.227±0.008	18.46±0.84	0.165±0.002	0.165±0.002	18.46±0.84	0.165±0.002	0.165±0.002	18.46±0.84
Saturados	61.43±1.8d	0.655±0.020	51.35±2.2a	0.584±0.039	0.584±0.039	48.80±3.9b	0.474±0.049	0.474±0.049	55.19±0.9c	0.494±0.017	0.494±0.017	55.19±0.9c	0.494±0.017	0.494±0.017	55.19±0.9c
Monoinsaturados	22.09±2.0a	0.232±0.026	29.42±2.4d	0.335±0.034	0.335±0.034	26.84±2.4c	0.261±0.025	0.261±0.025	25.52±0.8b	0.229±0.015	0.229±0.015	25.52±0.8b	0.229±0.015	0.229±0.015	25.52±0.8b
Polinsaturados	8.59±0.97	0.090±0.003	15.68±1.32	0.179±0.013	0.179±0.013	12.64±1.99	0.122±0.012	0.122±0.012	9.92±0.41	0.089±0.006	0.089±0.006	9.92±0.41	0.089±0.006	0.089±0.006	9.92±0.41
ω -3	11.02±0.34	0.117±0.013	11.86±0.89	0.135±0.013	0.135±0.013	11.67±1.19	0.114±0.013	0.114±0.013	13.38±0.43	0.120±0.008	0.120±0.008	13.38±0.43	0.120±0.008	0.120±0.008	13.38±0.43
ω -6	0.78±0.0b	0.078±0.01	1.32±0.1d	1.32±0.10	1.32±0.10	1.08±0.1c	1.08±0.11	1.08±0.11	0.74±0.0a	0.74±0.03	0.74±0.03	0.74±0.0a	0.74±0.03	0.74±0.03	0.74±0.0a
ω -3/ ω -6	1.62±0.1a	0.017±0.004	5.36±0.2d	0.061±0.002	0.061±0.002	3.51±0.2c	0.033±0.006	0.033±0.006	1.99±0.1b	0.018±0.000	0.018±0.000	1.99±0.1b	0.018±0.000	0.018±0.000	1.99±0.1b
DHA	1.73±0.17a	1.73±0.17	8.29±0.90d	8.29±0.90	8.29±0.90	6.42±0.37c	6.42±0.37	6.42±0.37	2.75±0.25b	2.75±0.46	2.75±0.46	2.75±0.25b	2.75±0.46	2.75±0.46	2.75±0.25b
DHA/EPA	8.53±0.52b	8.53±0.52b	8.25±0.63a	8.25±0.63a	8.25±0.63a	35.10±0.94d	35.10±0.94d	35.10±0.94d	19.90±1.15c	19.90±1.15c	19.90±1.15c	19.90±1.15c	19.90±1.15c	19.90±1.15c	19.90±1.15c
DHA/ARA	4.00±0.37b	4.00±0.37b	1.00±0.12a	1.00±0.12a	1.00±0.12a	5.74±0.37c	5.74±0.37c	5.74±0.37c	7.40±0.61d	7.40±0.61d	7.40±0.61d	7.40±0.61d	7.40±0.61d	7.40±0.61d	7.40±0.61d
EPA/ARA	±	1.061±0.12c	±	1.137±0.03d	1.137±0.03d	±	0.968±0.014b	0.968±0.014b	±	0.895±0.03a	0.895±0.03a	±	0.895±0.03a	0.895±0.03a	±
Total A.G.	±	1.96±0.13	±	4.55±0.16	4.55±0.16	±	2.64±0.14	2.64±0.14	±	2.19±0.21	2.19±0.21	±	2.19±0.21	2.19±0.21	±
Total Lípidos	±	1.96±0.13	±	4.55±0.16	4.55±0.16	±	2.64±0.14	2.64±0.14	±	2.19±0.21	2.19±0.21	±	2.19±0.21	2.19±0.21	±

A.G. ácido graso, DHA, docosaenoico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0,05).

Tabla 16. Composición de Ácidos Grasos (% del total A.G.), ácidos grasos x célula (A.G. pg.cél⁻¹) y lípidos totales x célula (pg.cél⁻¹) en *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes concentraciones **mM de Hierro**.

Acido Graso	[0]			[0,1]			[1,0]			[10,0]			[20,0]			[100,0]		
	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.
12:0	0.38±0.01	0.002±0.000	0.23±0.01	0.29±0.03	0.002±0.000	0.003±0.000	0.89±0.05	0.017±0.002	0.60±0.02	0.017±0.002	0.017±0.003	0.19±0.01	0.60±0.02	0.017±0.003	0.19±0.01	0.007±0.000	0.128±0.010	0.005±0.000
14:0	21.49±2.53	0.141±0.014	18.33±1.69	10.29±1.19	0.132±0.012	0.121±0.017	14.44±1.62	0.306±0.036	9.61±0.50	0.306±0.036	0.278±0.015	15.85±0.10	9.61±0.50	0.278±0.015	15.85±0.10	0.128±0.010	0.005±0.000	0.005±0.000
15:0	0.96±0.03	0.006±0.000	0.70±0.09	0.61±0.02	0.005±0.000	0.007±0.000	0.34±0.01	0.008±0.000	0.38±0.02	0.008±0.000	0.011±0.001	0.59±0.05	0.38±0.02	0.011±0.001	0.59±0.05	0.005±0.000	0.005±0.000	0.005±0.000
16:0	21.26±1.54	0.141±0.014	20.61±1.96	0.147±0.010	0.147±0.010	0.159±0.014	14.83±1.29	0.341±0.036	12.27±1.16	0.341±0.036	0.357±0.032	17.39±1.70	12.27±1.16	0.357±0.032	17.39±1.70	0.141±0.020	0.005±0.000	0.005±0.000
16:1(n-7)	7.64±0.39	0.049±0.003	7.50±0.10	0.053±0.006	0.053±0.006	0.061±0.004	3.39±0.39	0.083±0.004	4.13±0.15	0.083±0.004	0.122±0.013	6.36±0.36	4.13±0.15	0.122±0.013	6.36±0.36	0.052±0.003	0.005±0.000	0.005±0.000
16:2(n-6)	0.28±0.01	0.002±0.000	0.26±0.01	0.002±0.000	0.002±0.000	0.004±0.000	0.05±0.00	0.008±0.000	0.07±0.00	0.008±0.000	0.002±0.000	0.27±0.01	0.07±0.00	0.002±0.000	0.27±0.01	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000
16:2(n-4)	0.65±0.03	0.004±0.000	0.75±0.03	0.005±0.000	0.005±0.000	0.005±0.000	0.27±0.01	0.006±0.000	0.32±0.03	0.006±0.000	0.009±0.000	0.58±0.06	0.32±0.03	0.009±0.000	0.58±0.06	0.005±0.000	0.005±0.000	0.005±0.000
18:0	0.57±0.02	0.004±0.000	0.23±0.02	0.23±0.02	0.0015±0.000	0.039±0.004	2.51±0.26	0.054±0.003	2.81±0.26	0.054±0.003	0.082±0.002	0.45±0.01	2.81±0.26	0.082±0.002	0.45±0.01	0.004±0.000	0.004±0.000	0.004±0.000
18:1(n-9)	24.88±2.92	0.171±0.017	27.97±2.35	0.198±0.009	0.198±0.009	0.281±0.019	24.89±2.59	0.663±0.043	27.52±1.71	0.663±0.043	0.816±0.020	25.38±1.58	27.52±1.71	0.816±0.020	25.38±1.58	0.004±0.000	0.004±0.000	0.004±0.000
18:1(n-7)	0.48±0.02	0.003±0.000	3.55±0.40	0.027±0.002	0.027±0.002	0.008±0.000	1.13±0.15	0.029±0.002	0.92±0.09	0.029±0.002	0.027±0.005	4.35±0.52	0.92±0.09	0.027±0.005	4.35±0.52	0.035±0.004	0.005±0.000	0.005±0.000
18:2(n-6)	2.53±0.24	0.016±0.003	2.98±0.10	0.022±0.002	0.022±0.002	0.06±0.005	5.58±0.59	0.159±0.014	7.16±0.57	0.159±0.014	0.214±0.026	3.06±0.10	7.16±0.57	0.214±0.026	3.06±0.10	0.025±0.003	0.005±0.000	0.005±0.000
18:3(n-6)	0.03±0.00	0.002±0.000	0.06±0.00	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.46±0.03	0.015±0.002	0.89±0.04	0.015±0.002	0.027±0.001	0.06±0.00	0.89±0.04	0.027±0.001	0.06±0.00	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
18:3(n-3)	3.46±0.34	0.022±0.005	3.12±0.38	0.023±0.003	0.023±0.003	0.060±0.001	4.58±0.46	0.132±0.012	4.72±0.41	0.132±0.012	0.140±0.013	4.00±0.19	4.72±0.41	0.140±0.013	4.00±0.19	0.032±0.002	0.005±0.000	0.005±0.000
18:4(n-3)	5.71±0.57	0.038±0.001	5.56±0.61	0.042±0.003	0.042±0.003	0.155±0.014	10.26±1.15	0.330±0.032	11.81±1.52	0.330±0.032	0.351±0.038	7.07±0.29	11.81±1.52	0.351±0.038	7.07±0.29	0.057±0.002	0.005±0.000	0.005±0.000
20:0	0.22±0.02	0.001±0.000	0.18±0.01	0.022±0.001	0.022±0.001	0.001±0.000	0.25±0.01	0.007±0.000	0.22±0.01	0.007±0.000	0.006±0.000	0.19±0.02	0.22±0.01	0.006±0.000	0.19±0.02	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000
20:1(n-9)	0.59±0.01	0.004±0.000	0.38±0.03	0.003±0.000	0.003±0.000	0.007±0.000	0.83±0.03	0.024±0.002	0.58±0.02	0.024±0.002	0.016±0.001	0.73±0.02	0.58±0.02	0.016±0.001	0.73±0.02	0.006±0.000	0.006±0.000	0.006±0.000
20:2(n-9)	0.76±0.04	0.005±0.000	0.27±0.03	0.002±0.000	0.002±0.000	0.007±0.000	0.71±0.05	0.023±0.003	0.66±0.01	0.023±0.003	0.020±0.002	0.57±0.02	0.66±0.01	0.020±0.002	0.57±0.02	0.005±0.000	0.005±0.000	0.005±0.000
20:3(n-5)	0.06±0.006	0.000±0.000	0.07±0.00	0.000±0.000	0.000±0.000	0.002±0.000	0.67±0.08	0.014±0.001	0.68±0.07	0.014±0.001	0.017±0.002	0.006±0.000	0.67±0.08	0.017±0.002	0.006±0.000	0.006±0.000	0.006±0.000	0.006±0.000
20:4(n-6)	0.27±0.02	0.002±0.000	0.21±0.05	0.002±0.000	0.002±0.000	0.006±0.000	0.43±0.01	0.014±0.001	0.43±0.03	0.014±0.001	0.004±0.000	0.12±0.00	0.43±0.03	0.013±0.000	0.12±0.00	0.005±0.000	0.005±0.000	0.005±0.000
20:5(n-3)	0.52±0.01	0.004±0.000	0.60±0.02	0.004±0.000	0.004±0.000	0.004±0.000	0.37±0.02	0.010±0.001	0.45±0.07	0.010±0.001	0.014±0.002	0.60±0.01	0.45±0.07	0.014±0.002	0.60±0.01	0.005±0.000	0.005±0.000	0.005±0.000
22:1	0.23±0.01	0.002±0.000	0.31±0.02	0.002±0.000	0.002±0.000	0.009±0.000	0.12±0.01	0.003±0.000	0.16±0.02	0.003±0.000	0.005±0.000	0.32±0.00	0.16±0.02	0.005±0.000	0.32±0.00	0.003±0.000	0.003±0.000	0.003±0.000
22:5	1.64±0.15	0.011±0.001	1.53±0.16	0.011±0.001	0.011±0.001	0.073±0.003	3.63±0.37	0.102±0.010	5.15±0.31	0.102±0.010	0.157±0.016	2.53±0.25	5.15±0.31	0.157±0.016	2.53±0.25	0.021±0.002	0.002±0.000	0.002±0.000
22:6(n-3)	5.32±0.13	0.0375±0.000	4.55±0.32	0.035±0.002	0.035±0.002	0.109±0.014	9.95±0.30	0.179±0.016	10.06±1.03	0.179±0.016	0.296±0.028	9.03±0.83	10.06±1.03	0.296±0.028	9.03±0.83	0.073±0.001	0.007±0.000	0.007±0.000
Saturados	45.40±3.95	0.299±0.018	40.88±4.30	0.293±0.035	0.293±0.035	0.334±0.011	34.64±3.56	0.743±0.013	26.35±2.69	0.743±0.013	0.766±0.070	35.27±3.54	26.35±2.69	0.766±0.070	35.27±3.54	0.286±0.026	0.026±0.001	0.026±0.001
Monoinsaturados	33.82±2.34	0.229±0.028	39.71±3.39	0.284±0.021	0.284±0.021	0.359±0.024	31.37±2.90	0.803±0.051	33.31±1.42	0.803±0.051	0.986±0.022	37.13±1.65	33.31±1.42	0.986±0.022	37.13±1.65	0.301±0.017	0.017±0.000	0.017±0.000
Poliinsaturados	20.78±2.0d	0.139±0.015	19.42±1.8d	0.145±0.017	0.145±0.017	0.487±0.014	33.99±1.7c	0.975±0.090	40.34±4.2a	0.975±0.090	1.206±0.013	27.59±2.9b	40.34±4.2a	1.206±0.013	27.59±2.9b	0.224±0.025	0.025±0.001	0.025±0.001
ω -3	14.82±1.48	0.101±0.014	13.49±1.49	0.101±0.015	0.101±0.015	0.331±0.010	17.94±1.09	0.296±0.028	25.41±2.98	0.296±0.028	0.758±0.020	18.02±0.81	25.41±2.98	0.758±0.020	18.02±0.81	0.145±0.006	0.006±0.000	0.006±0.000
ω -6	2.84±0.25	0.018±0.003	3.29±0.18	0.024±0.001	0.024±0.001	0.070±0.001	4.95±0.47	0.083±0.004	8.12±0.90	0.083±0.004	0.244±0.027	2.68±0.07	8.12±0.90	0.244±0.027	2.68±0.07	0.022±0.001	0.001±0.000	0.001±0.000
ω -3/ ω -6	5.21±0.6e	0.0375±0.000	4.10±0.2c	0.035±0.002	0.035±0.002	0.109±0.014	9.95±0.3d	0.179±0.016	10.06±1.0d	0.179±0.016	0.296±0.028	9.03±0.8c	10.06±1.0d	0.296±0.028	9.03±0.8c	0.073±0.001	0.001±0.000	0.001±0.000
DHA	5.32±0.1b	0.0375±0.000	4.55±0.3a	0.035±0.002	0.035±0.002	0.109±0.014	9.95±0.3d	0.179±0.016	10.06±1.0d	0.179±0.016	0.296±0.028	9.03±0.8c	10.06±1.0d	0.296±0.028	9.03±0.8c	0.073±0.001	0.001±0.000	0.001±0.000
DHA/EPA	19.66±1.2b	0.136±0.005	20.41±2.3c	0.204±0.012	0.204±0.012	0.60±0.03	18.24±1.5a	0.231±0.011	23.13±1.19	0.231±0.011	0.296±0.028	29.12±2.4e	23.13±1.19	0.296±0.028	29.12±2.4e	0.021±0.002	0.002±0.000	0.002±0.000
DHA/ARA	76.00±3.12c	0.500±0.03d	91.00±5.36d	0.752±0.031b	0.752±0.031b	1.180±0.01b	4.08±0.0d	0.721±0.01b	5.34±0.12	0.721±0.01b	1.79±0.17	1.79±0.17	5.34±0.12	1.79±0.17	1.79±0.17	0.073±0.001	0.001±0.000	0.001±0.000
EPA/ARA	3.86±0.3c	0.022±0.001	4.20±0.2d	0.022±0.001	0.022±0.001	0.072±0.001	0.022±0.001	0.072±0.001	0.022±0.001	0.072±0.001	0.022±0.001	0.022±0.001	0.022±0.001	0.022±0.001	0.022±0.001	0.022±0.001	0.022±0.001	0.022±0.001
Total A.G.	±	0.667±0.02a	±	0.721±0.01b	0.721±0.01b	1.180±0.01b	4.08±0.0d	0.721±0.01b	5.34±0.12	0.721±0.01b	1.79±0.17	1.79±0.17	5.34±0.12	1.79±0.17	1.79±0.17	0.073±0.001	0.001±0.000	0.001±0.000
Total Lípidos	±	1.79±0.17	±	5.34±0.12	5.34±0.12	1.180±0.01b	4.08±0.0d	1.180±0.01b	5.34±0.12	1.180±0.01b	1.79±0.17	1.79±0.17	5.34±0.12	1.79±0.17	1.79±0.17	0.073±0.001	0.001±0.000	0.001±0.000

A.G. ácido graso, DHA, docosaenoico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0.05).

Tabla 17. Composición de Ácidos Grasos (% del total A.G.), ácidos grasos x célula (A.G. pg.cél⁻¹) y lípidos totales x célula (pg.cél⁻¹) en *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes concentraciones **mm de Azufre**. A.G. ácido graso, DHA, docosaenoico. Los valores son la media ± SD (n=3)

Ácido Graso	[0]			[0,1]			[1,0]			[10,0]			[100,0]		
	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	pg.cél ⁻¹
12:0	0.09±0.00	0.0006±0.00	0.15±0.02	0.15±0.00	0.0015±0.00	0.10±0.01	0.10±0.01	0.0015±0.00	0.21±0.01	0.002±0.000	0.15±0.01	0.0015±0.00	0.0015±0.00	0.0015±0.00	0.0015±0.00
14:0	27.31±2.60	0.185±0.018	25.47±2.75	25.47±0.054	0.244±0.054	24.44±2.16	24.44±2.16	0.283±0.015	30.39±2.28	0.228±0.013	23.85±1.80	0.262±0.034	0.262±0.034	0.262±0.034	0.262±0.034
15:0	1.01±0.13	0.007±0.000	0.53±0.01	0.005±0.000	0.005±0.000	0.49±0.01	0.49±0.01	0.005±0.000	0.76±0.02	0.006±0.000	0.46±0.03	0.005±0.000	0.005±0.000	0.005±0.000	0.005±0.000
16:0	26.35±2.96	0.181±0.014	25.17±0.95	0.239±0.033	0.239±0.033	27.06±2.52	27.06±2.52	0.304±0.012	29.09±1.20	0.219±0.025	23.22±1.55	0.251±0.025	0.251±0.025	0.251±0.025	0.251±0.025
16:1(n-7)	10.56±1.38	0.073±0.001	5.28±0.50	0.050±0.003	0.050±0.003	5.52±0.59	5.52±0.59	0.060±0.002	5.63±0.49	0.042±0.001	12.84±1.38	0.213±0.028	0.213±0.028	0.213±0.028	0.213±0.028
16:2(n-6)	0.23±0.03	0.002±0.000	0.10±0.01	0.008±0.000	0.008±0.000	0.10±0.01	0.10±0.01	0.009±0.000	0.05±0.00	0.0004±0.00	0.10±0.02	0.0015±0.00	0.0015±0.00	0.0015±0.00	0.0015±0.00
16:2(n-4)	0.99±0.06	0.007±0.000	0.31±0.02	0.003±0.000	0.003±0.000	0.21±0.02	0.21±0.02	0.002±0.000	0.15±0.01	0.001±0.000	0.19±0.01	0.0028±0.00	0.0028±0.00	0.0028±0.00	0.0028±0.00
18:0	1.15±0.02	0.008±0.000	0.42±0.04	0.004±0.000	0.004±0.000	0.07±0.00	0.07±0.00	0.006±0.000	0.68±0.11	0.006±0.000	0.08±0.00	0.008±0.00	0.008±0.00	0.008±0.00	0.008±0.00
18:1(n-9)	15.55±1.73	0.107±0.012	17.10±1.27	0.162±0.018	0.162±0.018	16.00±1.56	16.00±1.56	0.164±0.019	17.31±1.79	0.131±0.016	16.72±1.81	0.195±0.013	0.195±0.013	0.195±0.013	0.195±0.013
18:1(n-7)	0.65±0.01	0.004±0.000	0.39±0.03	0.0035±0.00	0.0035±0.00	0.06±0.00	0.06±0.00	0.006±0.000	0.10±0.01	0.0007±0.00	0.22±0.03	0.004±0.000	0.004±0.000	0.004±0.000	0.004±0.000
18:2(n-6)	2.74±0.25	0.019±0.002	1.24±0.12	0.012±0.002	0.012±0.002	1.12±0.13	1.12±0.13	0.012±0.003	0.70±0.01	0.005±0.000	1.67±0.17	0.028±0.024	0.028±0.024	0.028±0.024	0.028±0.024
18:3(n-6)	0.10±0.02	0.0006±0.00	0.02±0.00	0.0002±0.00	0.0002±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.0002±0.00	0.01±0.00	0.0001±0.00	2.83±0.29	0.055±0.005	0.055±0.005	0.055±0.005	0.055±0.005
18:3(n-3)	3.58±0.29	0.024±0.000	1.09±0.13	0.010±0.002	0.010±0.002	1.30±0.14	1.30±0.14	0.013±0.002	0.78±0.03	0.006±0.000	1.75±0.16	0.029±0.003	0.029±0.003	0.029±0.003	0.029±0.003
18:4(n-3)	4.30±0.49	0.029±0.002	4.95±0.11	0.047±0.001	0.047±0.001	5.01±0.48	5.01±0.48	0.054±0.001	1.98±0.17	0.015±0.001	3.71±0.29	0.059±0.006	0.059±0.006	0.059±0.006	0.059±0.006
20:0	0.02±0.00	0.0001±0.00	0.00±0.00	0.000±0.00	0.000±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.000±0.00	0.02±0.00	0.0002±0.00	0.06±0.00	0.001±0.000	0.001±0.000	0.001±0.000	0.001±0.000
20:1(n-9)	0.30±0.01	0.002±0.000	0.08±0.00	0.008±0.00	0.008±0.00	0.10±0.01	0.10±0.01	0.001±0.000	0.06±0.00	0.0005±0.00	0.28±0.03	0.005±0.000	0.005±0.000	0.005±0.000	0.005±0.000
20:2(n-9)	0.16±0.01	0.001±0.000	0.03±0.00	0.0003±0.00	0.0003±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	0.0003±0.00	0.05±0.00	0.0004±0.00	0.09±0.00	0.0013±0.00	0.0013±0.00	0.0013±0.00	0.0013±0.00
20:3(n-5)	0.04±0.00	0.0003±0.00	0.02±0.00	0.0002±0.00	0.0002±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.0002±0.00	0.02±0.00	0.0001±0.00	0.03±0.00	0.0004±0.00	0.0004±0.00	0.0004±0.00	0.0004±0.00
20:4(n-3)	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
20:4(n-6)	0.06±0.01	0.0004±0.00	0.34±0.00	0.0004±0.00	0.0004±0.00	0.33±0.00	0.33±0.00	0.0003±0.00	0.16±0.00	0.0005±0.00	0.13±0.01	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000
20:5(n-3)	0.26±0.02	0.002±0.000	0.53±0.02	0.0052±0.00	0.0052±0.00	0.77±0.03	0.77±0.03	0.008±0.000	1.04±0.15	0.0078±0.00	0.93±0.05	0.0087±0.00	0.0087±0.00	0.0087±0.00	0.0087±0.00
22:0	0.57±0.04	0.004±0.000	0.49±0.02	0.0045±0.00	0.0045±0.00	0.51±0.04	0.51±0.04	0.006±0.000	0.74±0.01	0.0055±0.00	0.65±0.01	0.0079±0.00	0.0079±0.00	0.0079±0.00	0.0079±0.00
22:1	0.09±0.00	0.0006±0.00	0.31±0.01	0.003±0.00	0.003±0.00	0.23±0.01	0.23±0.01	0.0025±0.00	0.34±0.03	0.0025±0.00	0.26±0.01	0.0028±0.00	0.0028±0.00	0.0028±0.00	0.0028±0.00
22:5	1.11±0.17	0.007±0.000	4.06±0.59	0.039±0.001	0.039±0.001	4.21±0.37	4.21±0.37	0.045±0.001	2.80±0.26	0.021±0.002	1.92±0.14	0.023±0.002	0.023±0.002	0.023±0.002	0.023±0.002
22:6(n-3)	2.80±0.26	0.019±0.003	12.22±1.31	0.117±0.013	0.117±0.013	12.60±0.67	12.60±0.67	0.139±0.014	7.01±0.88	0.053±0.002	3.83±0.17	0.061±0.002	0.061±0.002	0.061±0.002	0.061±0.002
Saturados	56.49±0.30	0.386±0.024	52.24±2.89	0.498±0.048	0.498±0.048	52.67±5.02	52.67±5.02	0.599±0.028	61.90±2.12	0.465±0.046	48.48±2.86	0.529±0.058	0.529±0.058	0.529±0.058	0.529±0.058
Monounsaturados	27.14±2.0d	0.187±0.014	23.16±2.1b	0.219±0.019	0.219±0.019	21.91±2.7a	21.91±2.7a	0.228±0.008	23.45±2.6e	0.177±0.016	30.32±2.2c	0.419±0.031	0.419±0.031	0.419±0.031	0.419±0.031
Poliinsaturados	16.37±1.7b	0.111±0.017	24.60±2.1d	0.235±0.026	0.235±0.026	25.42±2.2e	25.42±2.2e	0.275±0.026	14.66±1.8a	0.110±0.014	21.20±1.7c	0.328±0.036	0.328±0.036	0.328±0.036	0.328±0.036
ω -3	11.00±1.33	0.074±0.001	18.83±1.40	0.180±0.015	0.180±0.015	19.71±1.33	19.71±1.33	0.214±0.025	10.88±1.15	0.082±0.003	9.73±0.76	0.091±0.002	0.091±0.002	0.091±0.002	0.091±0.002
ω -6	3.06±0.35	0.021±0.002	1.35±0.13	0.013±0.002	0.013±0.002	1.24±0.14	1.24±0.14	0.013±0.004	0.75±0.01	0.0056±0.00	0.74±0.01	0.007±0.000	0.007±0.000	0.007±0.000	0.007±0.000
ω -3/ω -6	3.59±0.1a	0.019±0.003	13.95±1.6c	0.117±0.013	0.117±0.013	15.89±1.2e	15.89±1.2e	0.139±0.014	14.51±1.2d	0.053±0.002	13.15±1.4b	0.061±0.002	0.061±0.002	0.061±0.002	0.061±0.002
DHA	2.80±0.26a	0.019±0.003	12.22±1.3d	0.117±0.013	0.117±0.013	12.60±0.6e	12.60±0.6e	0.139±0.014	7.01±0.8c	0.053±0.002	3.83±0.2b	0.061±0.002	0.061±0.002	0.061±0.002	0.061±0.002
DHA/EPA	10.76±1.2a	10.76±1.23	23.06±1.2e	23.06±1.23	23.06±1.23	16.36±1.2d	16.36±1.2d	16.36±1.20	6.74±0.3b	6.74±0.26	4.11±0.5a	4.11±0.51	4.11±0.51	4.11±0.51	4.11±0.51
DHA/ARA	46.67±3.5e	35.94±2.6b	38.18±2.3c	38.18±2.3c	38.18±2.3c	2.33±0.2b	2.33±0.2b	2.33±0.2b	6.51±0.4d	6.51±0.4d	7.15±0.4e	7.15±0.4e	7.15±0.4e	7.15±0.4e	7.15±0.4e
EPA/ARA	4.33±0.17c	1.56±0.1a	1.56±0.1a	1.56±0.1a	1.56±0.1a	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
Total A.G.	±	0.684±0.05a	±	0.952±0.01c	0.952±0.01c	±	±	1.102±0.13d	±	0.753±0.07b	±	1.276±0.15e	1.276±0.15e	1.276±0.15e	1.276±0.15e
Total Lípidos	±	2.61±0.17	±	3.10±0.16	3.10±0.16	±	±	3.13±0.23	±	3.07±0.11	±	2.14±0.21	2.14±0.21	2.14±0.21	2.14±0.21

Tabla 18. Composición de Ácidos Grasos (% del total A.G.), ácidos grasos x célula (A.G. pg.cél⁻¹) y lípidos totales x célula (pg.cél⁻¹) en *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes concentraciones mM de Zinc.

Acido Graso	[0]			[0,1]			[1,0]			[10,0]			[100,0]		
	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	
12:0	0.22±0.03	0.002±0.000	0.34±0.06	0.002±0.000	0.002±0.000	1.96±0.07	0.046±0.003	0.33±0.01	0.002±0.000	0.33±0.01	0.002±0.000	0.24±0.02	0.0015±0.00		
14:0	16.49±1.56	0.124±0.013	18.17±1.21	0.132±0.012	0.132±0.012	12.39±1.14	0.313±0.018	15.88±1.32	0.105±0.014	15.88±1.32	0.105±0.014	16.44±1.05	0.104±0.012		
15:0	0.57±0.03	0.004±0.000	0.55±0.03	0.004±0.000	0.004±0.000	0.78±0.02	0.018±0.004	0.55±0.06	0.004±0.000	0.55±0.06	0.004±0.000	0.53±0.02	0.003±0.000		
16:0	18.83±2.82	0.138±0.014	18.38±0.76	0.133±0.013	0.133±0.013	14.80±0.48	0.369±0.001	18.35±1.15	0.121±0.013	18.35±1.15	0.121±0.013	17.76±0.88	0.111±0.011		
16:1(n-7)	7.30±0.36	0.052±0.001	7.15±0.50	0.052±0.002	0.052±0.002	5.64±0.23	0.132±0.002	6.99±0.17	0.047±0.005	6.99±0.17	0.047±0.005	6.92±0.79	0.043±0.004		
16:2(n-6)	0.27±0.02	0.002±0.000	0.41±0.05	0.003±0.000	0.003±0.000	0.26±0.00	0.006±0.000	0.37±0.01	0.0025±0.00	0.37±0.01	0.0025±0.00	0.40±0.02	0.0025±0.00		
16:2(n-4)	0.74±0.06	0.006±0.000	0.67±0.01	0.005±0.000	0.005±0.000	0.97±0.03	0.023±0.003	0.79±0.01	0.005±0.000	0.79±0.01	0.005±0.000	0.84±0.02	0.0052±0.00		
18:0	0.85±0.06	0.006±0.000	0.35±0.03	0.002±0.000	0.002±0.000	3.12±0.37	0.073±0.001	0.44±0.04	0.003±0.000	0.44±0.04	0.003±0.000	0.46±0.05	0.003±0.000		
18:1(n-9)	25.05±1.12	0.180±0.016	23.59±1.71	0.171±0.009	0.171±0.009	18.35±1.52	0.453±0.047	27.06±1.72	0.180±0.009	27.06±1.72	0.180±0.009	26.55±2.71	0.165±0.007		
18:1(n-7)	0.84±0.07	0.006±0.000	0.41±0.02	0.003±0.000	0.003±0.000	1.83±0.17	0.043±0.005	0.47±0.06	0.003±0.000	0.47±0.06	0.003±0.000	0.50±0.02	0.003±0.000		
18:2(n-6)	4.64±0.54	0.034±0.007	4.01±0.50	0.029±0.001	0.029±0.001	4.35±0.37	0.102±0.011	4.04±0.47	0.027±0.003	4.04±0.47	0.027±0.003	4.18±0.47	0.026±0.003		
18:3(n-6)	0.17±0.01	0.001±0.000	0.13±0.01	0.0009±0.00	0.0009±0.00	0.21±0.00	0.005±0.000	0.08±0.00	0.006±0.00	0.08±0.00	0.006±0.00	0.10±0.01	0.0006±0.00		
18:3(n-3)	4.41±0.56	0.033±0.003	4.67±0.21	0.034±0.002	0.034±0.002	5.22±0.40	0.122±0.012	4.67±0.22	0.032±0.002	4.67±0.22	0.032±0.002	4.79±0.46	0.030±0.005		
18:4(n-3)	8.64±0.82	0.067±0.004	10.03±1.17	0.073±0.001	0.073±0.001	11.87±0.78	0.278±0.025	8.24±0.82	0.056±0.003	8.24±0.82	0.056±0.003	8.94±0.68	0.056±0.007		
20:0	0.17±0.02	0.001±0.000	0.12±0.01	0.0009±0.00	0.0009±0.00	0.28±0.03	0.006±0.000	0.19±0.02	0.0012±0.00	0.19±0.02	0.0012±0.00	0.15±0.01	0.0009±0.00		
20:1(n-9)	0.61±0.03	0.005±0.000	0.93±0.02	0.007±0.000	0.007±0.000	4.28±0.44	0.100±0.013	0.84±0.04	0.006±0.000	0.84±0.04	0.006±0.000	0.85±0.02	0.0054±0.00		
20:2(n-9)	3.56±0.37	0.032±0.002	0.24±0.03	0.002±0.000	0.002±0.000	2.37±0.26	0.054±0.008	0.34±0.02	0.0023±0.00	0.34±0.02	0.0023±0.00	0.25±0.02	0.0015±0.00		
20:3(n-5)	0.18±0.02	0.0015±0.00	0.08±0.00	0.0006±0.00	0.0006±0.00	0.14±0.01	0.003±0.000	0.09±0.00	0.006±0.00	0.09±0.00	0.006±0.00	0.09±0.00	0.0005±0.00		
20:4(n-6)	0.09±0.00	0.0007±0.00	0.08±0.00	0.0006±0.00	0.0006±0.00	0.15±0.02	0.003±0.000	0.17±0.00	0.004±0.00	0.17±0.00	0.004±0.00	0.09±0.00	0.0006±0.00		
20:5(n-3)	0.18±0.03	0.0014±0.00	0.30±0.04	0.002±0.000	0.002±0.000	0.60±0.01	0.014±0.002	0.26±0.03	0.002±0.000	0.26±0.03	0.002±0.000	0.30±0.04	0.002±0.000		
22:0	0.40±0.05	0.003±0.00	0.31±0.03	0.002±0.000	0.002±0.000	0.33±0.02	0.008±0.000	0.48±0.01	0.003±0.000	0.48±0.01	0.003±0.000	0.40±0.03	0.0025±0.00		
22:1	0.27±0.02	0.002±0.000	0.17±0.01	0.001±0.000	0.001±0.000	0.16±0.02	0.004±0.000	0.26±0.03	0.002±0.000	0.26±0.03	0.002±0.000	0.24±0.03	0.0015±0.00		
22:5	1.21±0.19	0.009±0.000	1.78±0.12	0.013±0.003	0.013±0.003	1.65±0.19	0.039±0.005	1.95±0.16	0.013±0.001	1.95±0.16	0.013±0.001	1.94±0.12	0.012±0.003		
22:6(n-3)	4.97±0.35	0.039±0.001	7.81±0.33	0.060±0.001	0.060±0.001	8.81±0.75	0.138±0.014	7.29±0.25	0.050±0.002	7.29±0.25	0.050±0.002	7.03±0.88	0.044±0.004		
Saturados	37.54±3.63	0.277±0.024	38.22±1.34	0.278±0.034	0.278±0.034	35.66±1.07	0.834±0.003	36.21±3.75	0.240±0.027	36.21±3.75	0.240±0.027	35.99±3.94	0.226±0.013		
Monoinsaturados	34.07±3.1d	0.246±0.022	32.26±2.2c	0.233±0.010	0.233±0.010	31.25±1.8a	0.732±0.061	35.62±1.4e	0.238±0.017	35.62±1.4e	0.238±0.017	35.07±3.5b	0.219±0.012		
Poliinsaturados	28.40±1.6b	0.220±0.012	29.52±2.2d	0.215±0.033	0.215±0.033	33.09±0.7e	0.774±0.003	28.17±1.0a	0.192±0.018	28.17±1.0a	0.192±0.018	28.94±1.4c	0.181±0.019		
ω-3	20.05±2.06	0.157±0.016	22.19±2.39	0.162±0.013	0.162±0.013	23.15±2.06	0.542±0.062	17.03±1.46	0.106±0.012	17.03±1.46	0.106±0.012	21.15±1.03	0.133±0.016		
ω-6	5.09±0.45	0.038±0.003	4.55±0.56	0.033±0.001	0.033±0.001	4.82±0.36	0.113±0.011	3.95±0.14	0.025±0.000	3.95±0.14	0.025±0.000	4.68±0.48	0.029±0.003		
ω-3/ω-6	3.94±0.3a	3.94±0.37	4.88±0.4d	4.88±0.49	4.88±0.49	4.80±0.0d	4.80±0.07	4.31±0.5b	4.31±0.50	4.31±0.5b	4.31±0.50	4.52±0.4c	4.52±0.48		
DHA	4.97±0.3a	0.039±0.002	7.14±0.3c	0.060±0.001	0.060±0.001	8.81±0.7e	0.138±0.014	7.29±0.2d	0.050±0.002	7.29±0.2d	0.050±0.002	7.03±0.8b	0.044±0.008		
DHA/EPA	27.61±3.1d	27.61±3.14	26.03±3.1c	26.03±3.13	26.03±3.13	14.68±1.0a	14.68±1.09	28.08±2.5e	28.08±2.59	28.08±2.5e	28.08±2.59	23.97±2.5b	23.97±2.59		
DHA/ARA	55.22±2.5b	55.22±2.5b	97.62±6.3e	97.62±6.3e	97.62±6.3e	58.73±4.5c	42.88±3.2a	78.11±5.5d	42.88±3.2a	78.11±5.5d	42.88±3.2a	3.33±0.29c	3.33±0.29c		
EPA/ARA	2.00±0.15b	2.00±0.15b	3.75±0.32d	3.75±0.32d	3.75±0.32d	4.00±0.38e	1.53±0.12a	0.670±0.07b	1.53±0.12a	0.670±0.07b	0.670±0.07b	±	±		
Total A.G.	±	0.743±0.01c	±	0.726±0.07c	0.726±0.07c	±	2.339±0.06d	±	±	±	±	±	0.626±0.04a		
Total Lípidos	±	2.26±0.18	±	3.39±0.14	3.39±0.14	±	4.28±0.11	±	±	±	±	±	3.56±0.23		

A.G. ácido graso, DHA, docosahexaenoico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0,05).

Tabla 19. Composición de Ácidos Grasos (% del total A.G.), ácidos grasos x célula (A.G. pg.cél⁻¹) y lípidos totales x célula (pg.cél⁻¹) en *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes concentraciones **mm de Cobre**.

Acido Graso	[0]			[0,1]			[1,0]			[10,0]			[100,0]		
	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	pg.cél ⁻¹
12:0	0.19±0.01	0.002±0.000	0.20±0.02	0.20±0.02	0.0024±0.00	0.24±0.02	0.24±0.02	0.002±0.000	0.14±0.01	0.14±0.01	0.001±0.000	0.14±0.01	0.001±0.000	0.14±0.01	0.001±0.000
14:0	21.38±2.59	0.219±0.027	18.35±1.47	18.35±1.47	0.210±0.015	14.95±1.61	14.95±1.61	0.138±0.016	22.40±2.73	22.40±2.73	0.191±0.014	22.40±2.73	0.191±0.014	22.40±2.73	0.191±0.014
15:0	0.41±0.02	0.0042±0.00	0.45±0.04	0.45±0.04	0.0053±0.00	0.44±0.01	0.44±0.01	0.004±0.000	0.66±0.02	0.66±0.02	0.006±0.000	0.66±0.02	0.006±0.000	0.66±0.02	0.006±0.000
16:0	21.02±2.72	0.215±0.026	16.46±1.62	16.46±1.62	0.189±0.013	15.50±1.43	15.50±1.43	0.136±0.017	18.11±1.45	18.11±1.45	0.154±0.019	18.11±1.45	0.154±0.019	18.11±1.45	0.154±0.019
16:1(n-7)	8.81±0.90	0.087±0.005	4.12±0.18	4.12±0.18	0.048±0.006	5.74±0.59	5.74±0.59	0.047±0.005	5.57±0.19	5.57±0.19	0.047±0.006	5.57±0.19	0.047±0.006	5.57±0.19	0.047±0.006
16:2(n-6)	0.17±0.02	0.002±0.000	0.16±0.01	0.16±0.01	0.002±0.000	0.27±0.01	0.27±0.01	0.002±0.000	0.20±0.01	0.20±0.01	0.002±0.000	0.20±0.01	0.002±0.000	0.20±0.01	0.002±0.000
16:2(n-4)	0.45±0.02	0.0044±0.00	0.44±0.03	0.44±0.03	0.005±0.000	0.53±0.03	0.53±0.03	0.004±0.000	0.54±0.02	0.54±0.02	0.005±0.000	0.54±0.02	0.005±0.000	0.54±0.02	0.005±0.000
18:0	3.29±0.14	0.036±0.004	1.19±0.18	1.19±0.18	0.013±0.001	1.36±0.13	1.36±0.13	0.012±0.001	0.60±0.02	0.60±0.02	0.005±0.000	0.60±0.02	0.005±0.000	0.60±0.02	0.005±0.000
18:1(n-9)	19.62±2.66	0.197±0.011	16.54±1.62	16.54±1.62	0.196±0.002	18.31±1.53	18.31±1.53	0.158±0.011	18.59±1.02	18.59±1.02	0.164±0.017	18.59±1.02	0.164±0.017	18.59±1.02	0.164±0.017
18:1(n-7)	0.47±0.04	0.0045±0.00	0.62±0.04	0.62±0.04	0.008±0.000	0.34±0.02	0.34±0.02	0.004±0.000	0.45±0.02	0.45±0.02	0.005±0.000	0.45±0.02	0.005±0.000	0.45±0.02	0.005±0.000
18:2(n-6)	2.70±0.25	0.027±0.001	2.63±0.28	2.63±0.28	0.032±0.001	2.45±0.27	2.45±0.27	0.023±0.001	2.46±0.27	2.46±0.27	0.024±0.002	2.46±0.27	0.024±0.002	2.46±0.27	0.024±0.002
18:3(n-6)	0.09±0.00	0.0009±0.00	11.48±1.30	11.48±1.30	0.147±0.014	0.98±0.05	0.98±0.05	0.015±0.002	1.57±0.16	1.57±0.16	0.020±0.003	1.57±0.16	0.020±0.003	1.57±0.16	0.020±0.003
18:3(n-3)	3.26±0.37	0.032±0.001	2.92±0.26	2.92±0.26	0.035±0.003	7.02±0.26	7.02±0.26	0.092±0.002	12.41±1.37	12.41±1.37	0.150±0.020	12.41±1.37	0.150±0.020	12.41±1.37	0.150±0.020
18:4(n-3)	7.73±0.93	0.078±0.003	6.97±0.31	6.97±0.31	0.082±0.002	6.69±0.69	6.69±0.69	0.064±0.002	6.48±0.72	6.48±0.72	0.063±0.004	6.48±0.72	0.063±0.004	6.48±0.72	0.063±0.004
20:0	0.13±0.02	0.0012±0.00	0.17±0.02	0.17±0.02	0.002±0.000	0.14±0.01	0.14±0.01	0.001±0.000	0.24±0.01	0.24±0.01	0.002±0.000	0.24±0.01	0.002±0.000	0.24±0.01	0.002±0.000
20:1(n-9)	0.30±0.02	0.003±0.000	0.48±0.01	0.48±0.01	0.006±0.000	0.53±0.01	0.53±0.01	0.005±0.000	0.77±0.04	0.77±0.04	0.008±0.000	0.77±0.04	0.008±0.000	0.77±0.04	0.008±0.000
20:2(n-9)	0.14±0.02	0.0014±0.00	0.15±0.02	0.15±0.02	0.002±0.000	0.17±0.02	0.17±0.02	0.001±0.000	0.09±0.00	0.09±0.00	0.0007±0.00	0.09±0.00	0.0007±0.00	0.09±0.00	0.0007±0.00
20:3(n-5)	0.06±0.00	0.0006±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.0005±0.00	0.05±0.00	0.05±0.00	0.0004±0.00	0.19±0.02	0.19±0.02	0.002±0.000	0.19±0.02	0.002±0.000	0.19±0.02	0.002±0.000
20:4(n-6)	0.07±0.00	0.0007±0.00	0.26±0.01	0.26±0.01	0.003±0.000	0.17±0.00	0.17±0.00	0.0006±0.00	0.10±0.01	0.10±0.01	0.001±0.000	0.10±0.01	0.001±0.000	0.10±0.01	0.001±0.000
20:5(n-3)	0.53±0.03	0.0056±0.00	0.92±0.06	0.92±0.06	0.010±0.001	0.51±0.02	0.51±0.02	0.004±0.000	0.41±0.02	0.41±0.02	0.004±0.000	0.41±0.02	0.004±0.000	0.41±0.02	0.004±0.000
22:0	0.57±0.02	0.006±0.000	0.76±0.05	0.76±0.05	0.009±0.000	0.58±0.02	0.58±0.02	0.005±0.000	0.43±0.01	0.43±0.01	0.004±0.000	0.43±0.01	0.004±0.000	0.43±0.01	0.004±0.000
22:1	0.25±0.02	0.003±0.000	0.19±0.01	0.19±0.01	0.002±0.000	0.32±0.03	0.32±0.03	0.003±0.000	0.19±0.03	0.19±0.03	0.002±0.000	0.19±0.03	0.002±0.000	0.19±0.03	0.002±0.000
22:5	2.61±0.19	0.027±0.001	5.35±0.20	5.35±0.20	0.070±0.008	7.92±0.79	7.92±0.79	0.104±0.014	1.69±0.15	1.69±0.15	0.015±0.002	1.69±0.15	0.015±0.002	1.69±0.15	0.015±0.002
22:6(n-3)	5.93±0.33	0.060±0.001	3.42±0.27	3.42±0.27	0.054±0.002	9.44±0.14	9.44±0.14	0.080±0.003	5.07±0.10	5.07±0.10	0.051±0.003	5.07±0.10	0.051±0.003	5.07±0.10	0.051±0.003
Saturados	46.99±3.20	0.483±0.018	37.57±3.96	37.57±3.96	0.431±0.041	33.22±1.89	33.22±1.89	0.299±0.028	42.57±5.42	42.57±5.42	0.363±0.030	42.57±5.42	0.363±0.030	42.57±5.42	0.363±0.030
Monoinsaturados	29.45±2.8d	0.294±0.027	21.97±2.2b	21.97±2.2b	0.260±0.029	25.24±1.5a	25.24±1.5a	0.218±0.014	25.57±2.6c	25.57±2.6c	0.225±0.022	25.57±2.6c	0.225±0.022	25.57±2.6c	0.225±0.022
Poliinsaturados	23.74±2.3a	0.239±0.038	40.47±5.4c	40.47±5.4c	0.503±0.025	41.54±1.7d	41.54±1.7d	0.476±0.045	31.86±2.6b	31.86±2.6b	0.339±0.033	31.86±2.6b	0.339±0.033	31.86±2.6b	0.339±0.033
ω -3	17.52±1.63	0.177±0.013	17.57±1.64	17.57±1.64	0.194±0.019	22.93±2.47	22.93±2.47	0.325±0.028	15.10±1.48	15.10±1.48	0.111±0.013	15.10±1.48	0.111±0.013	15.10±1.48	0.111±0.013
ω -6	2.96±0.27	0.029±0.002	8.24±0.81	8.24±0.81	0.109±0.013	2.96±0.29	2.96±0.29	0.040±0.003	2.36±0.27	2.36±0.27	0.017±0.002	2.36±0.27	0.017±0.002	2.36±0.27	0.017±0.002
ω -3/ω -6	5.92±0.3b	5.92±0.33	2.13±0.1a	2.13±0.1a	2.13±0.16	7.74±0.3d	7.74±0.3d	7.74±0.34	6.40±0.6c	6.40±0.6c	6.40±0.69	6.40±0.6c	6.40±0.69	6.40±0.6c	6.40±0.69
DHA	5.93±0.3c	0.060±0.001	3.42±0.2a	3.42±0.2a	0.054±0.001	9.44±0.1d	9.44±0.1d	0.080±0.003	5.64±0.1b	5.64±0.1b	0.051±0.003	5.64±0.1b	0.051±0.003	5.64±0.1b	0.051±0.003
DHA/EPA	11.19±1.2b	11.19±1.27	3.71±0.3a	3.71±0.3a	3.71±0.39	18.50±1.5d	18.50±1.5d	18.50±1.53	12.36±1.2c	12.36±1.2c	12.36±1.23	12.36±1.2c	12.36±1.23	12.36±1.2c	12.36±1.23
DHA/ARA	87.71±4.2d	13.15±1.0a	3.54±2.3b	3.54±2.3b	1.194±0.1d	2.20±0.18	2.20±0.18	3.52±0.08	4.01±0.3c	4.01±0.3c	0.928±0.03a	4.01±0.3c	0.928±0.03a	4.01±0.3c	0.928±0.03a
EPA/ARA	7.57±0.6d	1.015±0.1c	1.95±0.09	1.95±0.09	2.20±0.18	3.52±0.08	3.52±0.08	3.52±0.08	4.01±0.3c	4.01±0.3c	0.928±0.03a	4.01±0.3c	0.928±0.03a	4.01±0.3c	0.928±0.03a
Total A.G.	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
Total Lípidos	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±

A.G. ácido graso, DHA, docosaesaplenoico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0,05).

Capítulo 3

Evaluación poblacional, modificación bioquímica e incorporación de elementos unitarios por ***Artemia franciscana*** y ***Brachionus plicatilis***, ocasionada por el enriquecimiento en cultivo con ***Phaeodactylum tricornutum***, cultivada en sistema semicontinuo, con una tasa de renovación del 30% y concentración óptima de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} .

Introducción

El rotífero y *Artemia* han encontrado ser microorganismos valiosos e indispensables como alimento vivo en la larvicultura industrial de peces y crustáceos de todo el mundo (Lubzens *et al.*,1997; Lee and Ostrowski, 2001; Liao *et al.*,2001; Shields, 2001; Marte, 2003) utilizándose en aproximadamente el 85% de las especies cultivadas (Bhat, 1992). Rotífero y *Artemia* poseen varias características que los hacen presas vivas adecuadas para las larvas de peces recién eclosionadas, por ejemplo, tamaño relativamente pequeño, el comportamiento de natación lenta, tasa de reproducción y crecimiento rápido, posibilidad de ser cultivados en altas densidades (Lubzens, 1987; Lubzens *et al.*,1989, 2001; Narciso, 2000, Beck and Turingan 2007; Figueiredo *et al.*,2009), posibilidad de bioencapsulación con ácidos grasos altamente poliinsaturados, vitaminas, liposomas, antibióticos, microalgas, probióticos, terapéuticos; que son necesarios para el crecimiento y supervivencia de diferentes estadios larvales de peces o otros organismos marinos (Gatesoupe, 1982; Olsen *et al.*,1997; Ronsón-Paulín and Medina Reyna, 2002; Roque and Gómez-Gil, 2003; Gelabert, 2003, Medina-Reyna *et al.*,2004; Nordgreen *et al.*,2007, Seixas *et al.*,2009). Varios estudios han demostrado que tanto rotíferos como *Artemias* puede ser también utilizados para la transferencia de bacterias probióticas para larvas de peces (Rombaut *et al.*,1999; Makridis *et al.*,2000; Martínez-Díaz *et al.*,2003, Høj *et al.*,2009) así como también elementos minerales importantes dada su importancia en procesos fisiológicos y metamórficos en estadios larvales tempranos (Matsumoto *et al.*,2009). Los niveles de minerales y oligoelementos, con excepción del calcio, magnesio y hierro, son muy bajos en los rotíferos que en los copépodos. Sin embargo el magnesio a pesar de estar presente no se encuentra en las concentraciones adecuadas para cubrir los requisitos de estadios tempranos de peces marinos; como sucede con la no presencia de selenio, yodo entre otros, que son necesarios para procesos de metamorfosis, antioxidantes y enzimáticos en larvas peces (Hamre *et al.*,2008, Rider *et al.*,2009).

Un tópico muy de actualidad lo representa la nutrición mineral, la cual no se a estudiado muy afondo a pesar de saber que una gran cantidad de elementos están ligados a diversos procesos morfológicos, fisiológicos, pigmentación, supervivencia entre otros; principalmente en etapas tempranas de desarrollo larval de organismos acuáticos. Por ejemplo en la naturaleza, el zooplancton contiene un mayor contenido de Zn, Fe, Cu, S, Mg, Se, Si, Ca, Mn etc; que en *Artemia* recién eclosionada (Nguyen *et al.*,2008), es por ello que la incorporación directa o indirecta en el zooplancton o en piensos de larvas de peces como Boosting (Rider *et al.*,2009) o la incorporación vía la base de la cadena trófica es esencial; de forma que las larvas de distintas especies acuáticas dispongan de ellos y mejorar procesos de crecimiento, metamorfosis y supervivencia.

Diseño experimental

Se empleo un cultivo masivo del rotífero marino *Brachionus plicatilis* en Carboy's de 6 L, los cuales se filtraron y lavaron en periodos cortos con agua destilada para eliminar microbiota y posteriormente pasarlos a un nuevo carboy con agua de mar estéril. Tal proceso preventivo se realizó 24 h antes de iniciar los experimentos con la finalidad de estabulación

alimentaria y sanidad de los rotíferos. Para realizar las experiencias de crecimiento poblacional, modificación bioquímica e incorporación de elementos. Los rotíferos a razón de 50 rotíferos.mL⁻¹ se transfirieron a botellas de borosilicato de 1 L con 700 mL de agua de mar autoclavada, sometidos a un flujo de aire de 20 burbujas.minuto⁻¹ aproximadamente, ciclos de luz:oscuridad 12h:12h, se utilizó una intensidad luminosa de 52,3 $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y mantenidos en una cámara isotérmica con 22±2°C. A primera hora del ciclo de luz se alimentó al rotífero *Brachionus plicatilis*, a razón de 30,000 células.rotífero⁻¹ con biomasa de *Phaeodactylum tricornutum* (en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%) previamente cultivada con las concentraciones óptimas (para la mayor generación de biomasa, capítulo 1) de los elementos, por separado en el medio de cultivo "ALGAL" (Fábregas *et al.*,1984) en las siguientes concentraciones: Fe³⁺[20,0], S²⁻[0,1], Zn²⁺[0,1], Cu²⁺[0,1], Mg²⁺[1,0], Ca²⁺[1,0], Si⁴⁺[1,0] y Se²⁻[1,0].

Diariamente a primera hora del ciclo de luz se realizó el recuento de la densidad de rotíferos.mL⁻¹ así como del número de huevos por hembra, para posteriormente calcular la cantidad de biomasa celular para alimentar a razón de 30,000 células de *Phaeodactylum tricornutum*.rotífero⁻¹.

Los cultivos experimentales se mantuvieron durante 9 días tomando en cuenta que el ciclo de vida de *Brachionus plicatilis* dura aproximadamente 4 días (Ito 1955; 1957) por lo que los experimentos se finalizaron una vez transcurridas 2 generaciones. Al finalizar el periodo se contabilizó la densidad poblacional y número de huevos producidos, se cosecharon por triplicado 70 mL de cultivo para determinación de peso seco, cenizas y materia orgánica, así como 50 mL (*n*=3) de biomasa, en filtros de malla nitex de 40 μm para determinación de proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, e incorporación de metales; estas muestras se ultracongelaron a -80°C para su posterior análisis.

Se incubaron y eclosionaron en agua salobre al 2,5%, filtrada (1 μm), quistes de *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) del Gran Lago Salado Utha (INVE, Aquaculture, Inc.), en un baño termostático a 28±1°C, una intensidad luminosa de 152,3 $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; por 24h y un flujo de aireación continua de 250 mL/min¹ (figura 4a). Una vez eclosionados los nauplios se lavaron con agua destilada y formalina al 4% por 10 segundos, como tratamiento bacteriano preventivo; posteriormente se mantuvieron en agua marina estéril al 3,5%. Se espera a que los metanauplios cumplieran 48h después de la eclosión (DDE), tiempo en el cual han desarrollado un sistema digestivo eficaz-completo y pueden empezar a filtrar no selectivamente alimento (Sorgeloos *et al.*,2001). Para realizar las experiencias de crecimiento, supervivencia, modificación bioquímica e incorporación de elementos, los metanauplios_{48h} se transfirieron a razón de 2 metanauplios.mL⁻¹ en un volumen de 500mL en botellas de 1 L, sometidos a un flujo de aire de 20 burbujas.minuto⁻¹ aproximadamente, ciclos de luz:oscuridad 12h:12h, se utilizó una intensidad luminosa de 52,3 $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, las botellas de cultivo se mantuvieron en un baño termostático a 28±1°C dentro de una cámara isotérmica a 22±2°C.

A primera hora del ciclo de luz se alimentó a *Artemia franciscana*, a razón de 300,000 células.artemia⁻¹ (Gelabert, 2003) con biomasa de *Phaeodactylum tricornutum* (en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%) previamente cultivada con las concentraciones óptimas (para la mayor generación de biomasa, capítulo 1) de los elementos

por separado en el medio de cultivo "ALGAL" (Fábregas *et al.*, 1984) en las siguientes concentraciones: Fe^{3+} [20,0], S^{2-} [0,1], Zn^{2+} [0,1], Cu^{2+} [0,1], Mg^{2+} [1,0], Ca^{2+} [1,0], Si^{4+} [1,0] y Se^{2-} [1,0].

Diariamente se contabilizó la densidad de células. mL^{-1} del cultivo de *Artemia* para de esa forma corregir la ración diaria de microalgas de modo que entre el día 1 y 11 se utilizó una densidad celular de entre 300,000 y 6,000,000 células.*artemia* $^{-1}$

Los cultivos experimentales se mantuvieron por 10-11 días, tiempo en el cual comenzó el cortejo de apareamiento, para cosechar la población al día 10-11. Se contabilizó la densidad poblacional, se cosecharon por triplicado 40 organismos para determinación de peso seco, cenizas y materia orgánica, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, e incorporación de metales; estas muestras se ultracongelaron a -80°C para su posterior análisis.

Resultados y discusión.

Se observó que en los dos primeros días de alimentación del rotífero *Brachionus plicatilis* no mostró crecimiento poblacional e incluso disminución de la población inicial (figura 1 a-b), situación que además se corroboró por la presencia de biomasa celular no filtrada por los rotíferos en cultivo. Este comportamiento pudo ser debido como lo menciona Ferreira, 2006 en sus estudios sobre bioencapsulación y crecimiento poblacional de la misma especie de rotífero, por manipulación, causante de estrés, por lo que este tiempo debe considerarse como un periodo de adaptación o fase "lag", donde es posible la eclosión de los huevos producidos por las hembras adultas así como muerte por adaptación de las mismas. Posterior a este proceso a partir del 3er día (figura 1 a-b) la densidad poblacional de rotíferos comenzó a multiplicarse. Al respecto Snell, 1986; Lubzens and Minkoff, 1988; Hagiwara and Hino, 1990, mencionan que motivo de estrés fisicoquímico las hembras producen huevos dormantes por lo general entre 1 y 8 los cuales tardarán en eclosionar según las condiciones del medio de cultivo; siendo significativamente más pequeños que los 18-23 huevos producidos asexualmente posteriormente.

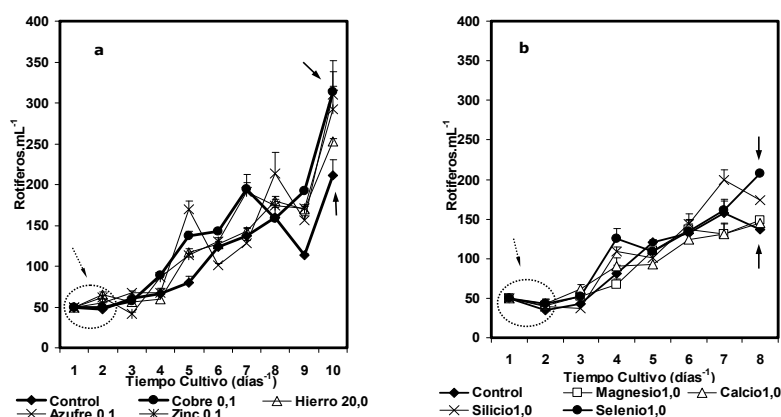


Figura 1. Evolución de la densidad de cultivo de *Brachionus plicatilis* (rotífero. mL^{-1}) alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada en semicontinuo, tasa de renovación 30% con diferentes elementos [mM].

La inclusión de los elementos y sus concentraciones óptimas ya citadas anteriormente, vía *Phaeodactylum tricornutum* produjeron muy diferentes evoluciones en la densidad poblacional final de *Brachionus plicatilis*, las cuales fluctuaron en el caso del hierro, cobre, azufre y zinc con respecto a un control entre 211 y 313 rotíferos.mL⁻¹ en tanto que para el magnesio, calcio, silicio y selenio con respecto a un control oscilaron entre 137 y 207 rotíferos.mL⁻¹ *tablas 1-2 y figura 1*. Existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo mencionadas ($p<0,05$). Schlosser and Anger, 1982; Lubzens, 1987; Miracle and Serra, 1989; Korstad *et al.*,1989; Hirayama, 1990; Hiawa and Heerkloss, 1994, Patiño, 1995, mencionan que en *Brachionus plicatilis* existen diferentes factores como la temperatura, salinidad, aireación, tipo-tamaño-concentración y calidad del alimento los cuales afectan la ingestión y la multiplicación poblacional; en el presente estudio todos los anteriores parámetros fueron mantenidos constantes excepto la calidad del alimento microalgal vía la incorporación de elementos por lo que las condiciones de cultivo de la microalga determinaron la supervivencia, tamaño, metamorfosis así como la tasa de reproducción de los organismos filtradores alimentados con ellas; por lo tanto es lógico de pensar que esta calidad del alimento vía la nutrición mineral es la que afecta la ya citada generación poblacional. Whyte and Nagata, 1990; Fulks and Main, 1992; Snell, 1991; Tamaru *et al.*,1991; Nagata and Whyte, 1992, Vadstein *et al.*,1993; Hansen *et al.*,1997 concluyen que la tasa reproductiva es fuertemente afectada por el tipo y calidad del alimento proveído en su cultivo (Qi *et al.*,2009), así como el tamaño de partícula y las especies de microalgas determinaran la tasa reproductiva de *Brachionus plicatilis* (Sayegh *et al.*,2007; Hu and Xi, 2008; Alva-Martínez *et al.*,2009).

Por otra parte la producción final de huevos.mL⁻¹ en el caso del hierro, cobre, azufre y zinc con respecto a un control osciló entre 45 y 119 huevos.mL⁻¹ (*tabla 1*) lo que corresponde a 0,21 y 0,38 huevos.hembra⁻¹ (*figura 2a*), en tanto que para el magnesio, calcio, silicio y selenio con respecto a un control fluctuaron entre 55 y 190 huevos.mL⁻¹ (*tabla 2*) lo que corresponde a 0,38 y 0,80 huevos.hembra⁻¹ (*figura 2a*), existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo mencionadas ($p<0,05$) *tablas 1-2*. Støttrup and McEvoy 2003 mencionan que la proporción de huevos depende de la calidad de los alimentos. Cualquier desviación de las condiciones óptimas del alimento se refleja en bajas o altas tasas de producción de huevos en los cultivos de rotíferos. Por ejemplo, en un estudio, una proporción de huevos de menos de 0,13 para cultivos de *Brachionus plicatilis* indica inestabilidad y el colapso futuro posible del cultivo (Snell *et al.*,1987). La producción de huevos por hembra al final con respecto al elemento en concentración ensayada ejemplo magnesio, calcio, silicio y selenio con respecto a un control no correspondió con la densidad poblacional final de rotíferos, en tanto que hierro, cobre, azufre y zinc si correspondió con la densidad poblacional de rotíferos; tales resultados pueden ser debidos a la viabilidad de eclosión de los huevos dada la calidad alimenticia de la diatomea vía el elemento; al respecto Camus *et al.*,2009; Gusmão and McKinnon, 2009 mencionan en su estudio que la alimentación con diatomeas en copépodos produjo una baja producción de huevos con respecto a otras dietas microalgales; sin embargo en nuestro estudio la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* y su enriquecimiento con diferentes

elementos mostró influir de manera positiva en la generación de huevos por parte de las hembras amícticas. En la *figura 2a* se pueden observar para el hierro, cobre, azufre y zinc dos picos máximos de producción de huevos en los días 4 y 8 de cultivo, en el caso del magnesio, calcio, silicio y selenio *figura 2b* es posible distinguir tres picos máximos de producción de huevos en los días 3, 6 y 8; resultados similares han sido descritos por Wullur *et al.*, 2009 modificando la salinidad; datos que nos sugieren las siguientes generaciones poblacionales, dentro de las cuales incluso coinciden con lo mencionado por Ito 1955; 1957; Wullur *et al.*, 2009 donde indican que el ciclo de vida generacional es cercano a 4 días, nuestros resultados revelan además que vía la inclusión de ciertos elementos que modifican la calidad microalgal es posible incluso modificar la tasa generacional en *Brachionus plicatilis* una herramienta biotecnológica muy importante en la producción de alimento vivo para los siguientes niveles tróficos acuáticos. Motivo del ritmo circadiano 12L:12O al que fueron sometidos los cultivos de rotíferos, se pudo observar una gran uniformidad de tallas, así mismo un gran número de hembras a primera hora del ciclo de luz mostraban entre 3 y 5 huevos, posterior a ese periodo fue solo ocasional encontrar hembras con huevos y la uniformidad de tallas se perdió. Al respecto Camus and Zeng, 2008 mencionan que con el copépodo *Acartia sinjiensis* la producción de huevos y eclosión de los mismos es debida al efecto del fotoperiodo al que se someten los cultivos masivos; tal y como ocurrió en el presente estudio con *Brachionus plicatilis*.

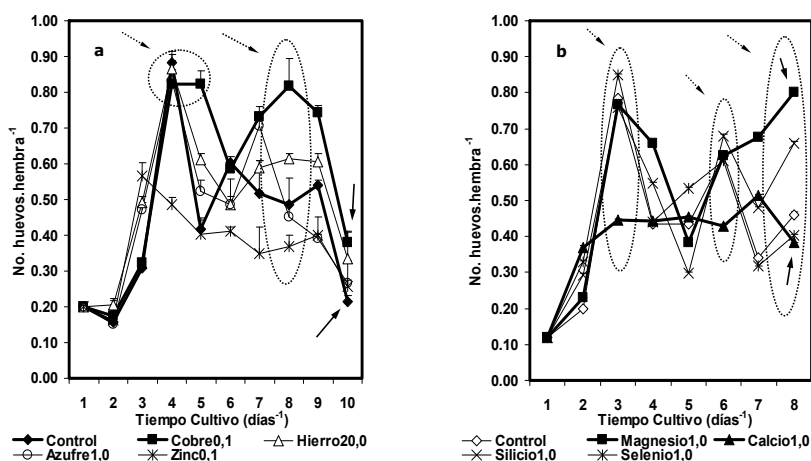


Figura 2. Evolución de la producción de huevos en *Brachionus plicatilis* (huevos.hembra⁻¹) alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada en semicontinuo, tasa de renovación 30% con diferentes elementos [mM].

Fábregas *et al.*, 1996b; 1998b indican que la tasa de renovación así como la concentración de nutrientes en efecto combinado en cultivos semicontinuos dan lugar a grandes diferencias en el valor nutritivo de *Phaeodactylum tricornutum*.

Se produjeron los siguientes valores de tasa de crecimiento poblacional (*r*) para los rotíferos alimentados con *Phaeodactylum tricornutum* enriquecida con la concentración óptima de magnesio, calcio, silicio, selenio y control 0,14, 0,13, 0,17, 0,18 y 0,12.día⁻¹ respectivamente; en tanto que para el hierro, cobre, azufre y zinc con respecto a un control 0,20, 0,23, 0,23, 0,22 y 0,18 día⁻¹ correspondientemente. Algunos autores obtuvieron tasas de crecimiento más altas en cultivos de rotífero alimentados con otras especies de

microalgas (Scott and Baynes, 1978; Yúfera and Pascual, 1983; Carić *et al.*, 1993, Ferreira, 2006; Hagiwara *et al.*, 2007; Wullur *et al.*, 2009), mencionando la mayoría de ellos un efecto de la especie de microalga, así como la salinidad; por otra parte dada la oscilación que observan nuestros resultados es evidente que los elementos ejercen un diferente efecto sobre la calidad nutricional de *Phaeodactylum tricornutum* y que impacta en dicha tasa de crecimiento. La que a su vez está relacionada con la cantidad de alimento y dependiendo del tipo de dieta la cantidad requerida para alcanzar la multiplicación máxima (Yúfera *et al.*, 1983; Lubzens *et al.*, 1995, Milione and Zeng, 2007).

En lo que respecta a la tasa de conversión alimenticia (TCA) y porcentaje de eficiencia de crecimiento (%EC), por el rotífero alimentado con la microalga en las concentraciones de elementos conocidas; fue muy variable mostrando los siguientes valores para: magnesio(0,94-104%), calcio(1,06-94%), silicio(1,03-97%), selenio(1,42-70%) con respecto a un control(1,10-90%) indicándonos en ambos casos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre el calcio y el silicio. En tanto que la TCA y %EC del rotífero con hierro, cobre, azufre y zinc con respecto a un control fue (1,90-52%), (1,63-61%), (1,85-54%), (1,73-58%) y (1,65-61%), existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$). Los valores de TCA nos indican cuan eficiente es el rotífero para vía la microalga con el elemento ganar peso, de modo, que tales valores entre mas cercanos a 1 sean o inferiores a 1, mejor será la TCA, la cual es muy eficiente con magnesio, calcio y silicio; donde el %EC es cercano y superior al 100%. Tal TCA coincide con los valores de peso seco expuestos posteriormente (tablas 1-2). El comportamiento de las anteriores variables nos da una idea de cuan importantes son ciertos elementos en la calidad del alimento vía la cadena trófica.

La inclusión de las concentraciones óptimas (capítulo 1) de magnesio, calcio, silicio, selenio, hierro, cobre, azufre y zinc con respecto a un control para la máxima generación de biomasa celular en *Phaeodactylum tricornutum* produjeron diferentes efectos como alimento en la composición bioquímica de *Brachionus plicatilis* de la siguiente manera: la biomasa celular con magnesio, calcio, silicio y selenio mostró la siguiente disposición bioquímica **Carbohidratos>Proteínas>Lípidos**(pg.cel⁻¹), en tanto que en los rotíferos una vez consumida la microalga la disposición fue **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos**(ng.rotífero⁻¹) en la mayoría de los casos (figura 3 a-b); en el caso de la biomasa celular con hierro, cobre, azufre y zinc reveló la siguiente composición proximal **Proteínas>Carbohidratos>Lípidos**(pg.cel⁻¹), y una vez consumida la microalga por el rotífero **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos** (ng.rotífero⁻¹) en la totalidad de los casos (figura 3 c-d).

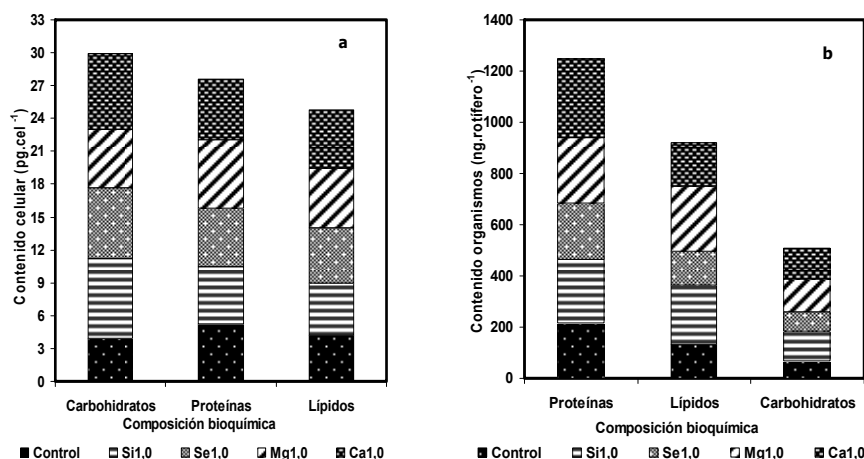


Figura 3.- Evolución de la composición bioquímica de *Phaeodactylum tricornutum* (a) (pg.cel⁻¹) y de *Brachionus plicatilis* (b) (ng.rotífero⁻¹) con respecto a Si⁴⁺, Se²⁻, Mg²⁺, y Ca²⁺.

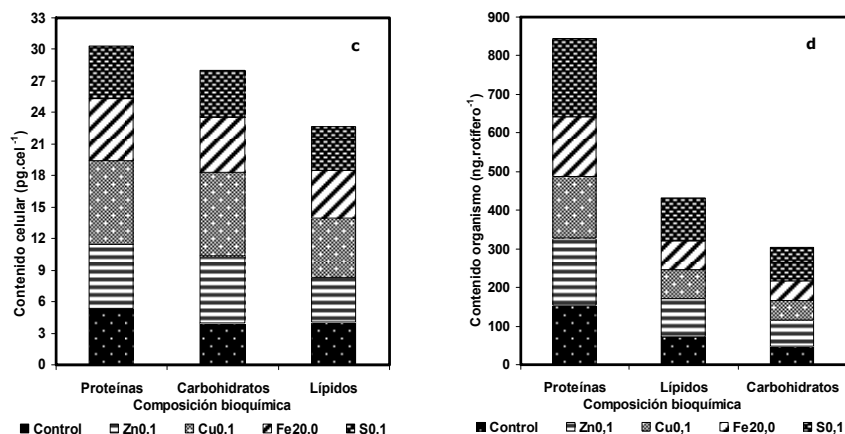


Figura 3.- Evolución de la composición bioquímica de *Phaeodactylum tricornutum* (c) (pg.cel⁻¹) y de *Brachionus plicatilis* (d) (ng.rotífero⁻¹) con respecto a Zn²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺ y S²⁻.

En orden de importancia energética el contenido de proteína en el rotífero fue el mayor combustible bioquímico (figura 3 b-d), una vez cultivado con la microalga y concentraciones conocidas de magnesio, calcio, silicio, selenio y control, mostrando los siguientes valores: 254,95, 308,56, 247,62, 218,99 y 217,10ng.rotífero⁻¹ comparativamente; existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$), tabla 1. Por lo que respecta al hierro, cobre, azufre, zinc y control se obtuvieron 155,51, 159,45, 202,32, 172,15 y 154,94ng.rotífero⁻¹ respectivamente; existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre el hierro y el control, (tabla 2).

En tanto que el segundo combustible lo representó el contenido de lípidos (figura 3 b-d) que para el magnesio, calcio, silicio, selenio y control mostró 252,70, 169,99, 230,87, 134,61 y 131,39ng.rotífero⁻¹ (tabla 1), en tanto que para el hierro, cobre, azufre, zinc y control, reveló valores de 74,24, 74,77, 111,37, 97,32 y 73,37ng.rotífero⁻¹ respectivamente

(*tabla 1*), indicando diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre el hierro y cobre (*tabla 2*).

Por lo que respecta a los carbohidratos (*figura 3 b-d*) valores de 126,70, 119,91, 115,09, 76,98 y 69,59ng.rotífero⁻¹ estuvieron presentes en magnesio, calcio, silicio, selenio y control comparativamente (*tabla 1*); así como 51,81, 51,08, 86,31, 65,85 y 48,91 ng.rotífero⁻¹ en hierro, cobre, azufre, zinc y control; indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre hierro y cobre (*tabla 2*).

Cuando el contenido de proteína se considera como porcentaje de la fracción orgánica, el valor de proteína según la concentración del elemento probado, fluctuó entre 40,18 y 55,89% *figura 4 a-b* y *tabla 1-2*. Resultados que se consideran óptimos ya que Lubzens *et al.*,1989; Frolov *et al.*,1991; Frolov and Pankov, 1992; Nagata and Whyte, 1992; Fernández-Reiriz *et al.*,1993; Reitan *et al.*,1993; Rainuzzo *et al.*,1997; Øie and Olsen, 1997; Makridis and Olsen, 1999, Lubzens *et al.*,2001; Lubzens and Zmora, 2003 muestran un rango de contenido de proteína en el rotífero de entre el 28 y 63%. El contenido de proteína por rotífero puede incrementarse de un 60-80% cuando se aumenta la ración alimenticia. Por lo que respecta a la fracción orgánica de los lípidos mostraron un rango de variación entre 26,21 y 39,85% *figura 4 a-b* y *tabla 1-2*. Teshima *et al.*,1987; Frolov *et al.*,1991; Nagata and White, 1992; Fernández-Reiriz *et al.*,1993; Rainuzzo *et al.*,1997; Lubzens *et al.*,2001; Lubzens and Zmora, 2003 mencionan que cerca del 34-43% de los lípidos en rotíferos son fosfolípidos y un 20-55% son triacilglicerol, con pequeñas concentraciones de monoacilglicerol, diacilglicerol, esterol, esterol esterol, y ácidos grasos libres. Los fosfolípidos y triacilglicerol muestran similares perfiles de ácidos grasos, pero estos son grandemente afectados por los lípidos proveídos en la alimentación del rotífero. El contenido lipídico porcentual de los rotíferos es generalmente más bajo que el del alimento porcentual, lo que indica que los lípidos son utilizados por los rotíferos. Los rotíferos utilizan proporciones altas de DHA para la reproducción (Øie and Olsen, 1997) y la utilización de los lípidos además dependerá de la temperatura (Olsen *et al.*,1993). Finalmente los carbohidratos revelaron un comportamiento entre el 16,63 y 21,58% al respecto Whyte and Nagata, 1990; Frolov *et al.*,1991; Frolov and Pankov, 1992; Nagata and Whyte, 1992; Fernández-Reiriz *et al.*,1993; Lubzens and Zmora, 2003 demostraron un rango entre el 10,5 y 27%. De donde el 61-80% es glucosa (como glicógeno), un 9-18% de ribosa y 0,8-7,0% de galactosa, manosa, deoxiglucosa, fucosa, y xilosa (Nagata and Whyte, 1992). La fracción orgánica hace más evidente la compartimentalización de los combustibles bioquímicos en *Brachionus plicatilis* además de ser evidente que la calidad del alimento vía la diversidad de elementos promovió la calidad proximal del rotífero. Es sabido además que la ración alimenticia afecta la tasa reproductiva del rotífero y su contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos.

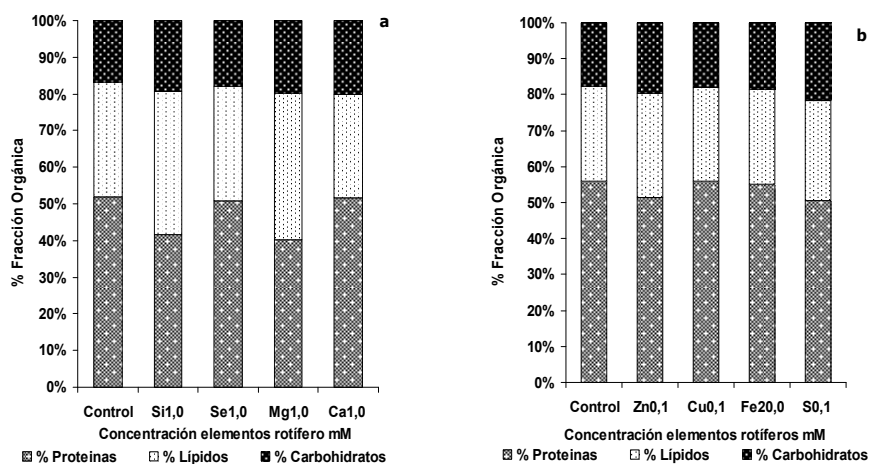


Figura 4.- Porcentaje de proteínas, lípidos y carbohidratos en *Brachionus plicatilis* respecto a la concentración de elementos en *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo: **(a)** Si^{4+} , Se^{2-} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , **(b)** Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , S^{2-} .

En lo que concierne al valor calórico (VC) por el rotífero con base en la calidad nutricional de *Phaeodactylum tricornutum* vía el magnesio, calcio, silicio, selenio y control mostró un rango de variación entre $115,94$ y $182,86 \times 10^{-7} \text{J.rotífero}^{-1}$ indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) (tabla 1); en tanto que vía el hierro, cobre, azufre, zinc y control manifestó una oscilación entre $74,51$ y $107,22 \times 10^{-7} \text{J.rotífero}^{-1}$ existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre el hierro y cobre (tabla 2). Fernández-Reiríz *et al.*, 1993; Lubzens and Zmora, 2003, mencionan que el valor calórico encontrado en los rotíferos dependerá de la dieta en un rango de $134 \times 10^{-7} \text{J.rotífero}^{-1}$ con levadura de cerveza y $200 \times 10^{-7} \text{J.rotífero}^{-1}$ después de 6 h de enriquecimiento con boostings. Demostrando nuestros resultados que la calidad del alimento del rotífero vía el enriquecimiento mineral mediante la microalga muestra diversos grados de calidad en el VC del rotífero en cultivo.

En lo que atañe al peso seco por rotífero en base al elemento en la alimentación con magnesio, calcio, silicio, selenio y control fluctuó en el rango de $426,62$ y $654,05 \text{ng.rotífero}^{-1}$ (tabla 1), por otra parte con hierro, cobre, azufre, zinc y control oscilo entre $286,78$ y $414,61 \text{ng.rotífero}^{-1}$ (tabla 2); indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre el hierro y cobre. Valores de peso seco que se corresponden con la evolución de el peso orgánico (proteínas+lípidos+carbohidratos ng.rotífero^{-1}) en el rango de $418,08$ - $634,32$ y $277,02$ - $400,00 \text{ng.rotífero}^{-1}$ respectivamente; y por ende con el contenido de materia orgánica por rotífero (tablas 1-2). Lubzens *et al.*, 1989 mencionan en sus investigaciones con *Brachionus plicatilis* que su valor nutricional dependerá de su peso seco, valor calórico y composición bioquímica y que es reflejo de la cantidad y calidad de su alimento.

El peso seco de un rotífero es muy variable en la literatura es frecuente hallar valores entre 300 y 600 ng , por lo que es evidente que en base a calidad del alimento vía la concentración de los elementos probados en este estudio ejerció un efecto en la variación del

peso seco por rotífero y no la ración diaria de *Phaeodactylum tricornutum* la cual siempre fue constante ($30,000 \text{ cel.rotífero}^{-1}$) y que además satisficó las necesidades del rotífero. Lubzens *et al.*, 1989 indican que el peso seco del rotífero dependerá por sobre todo del tamaño y estado nutricional. Yufera *et al.*, 1997 demuestran que el peso seco de *Brachionus plicatilis* se encuentra dependiendo de la calidad del alimento y tasa reproductiva entre 600 y 800 nanogramos por individuo.

En cuanto al contenido de cenizas por rotífero como se puede observar en la *figura 5a* y *tabla 1* vario con respecto al elemento probado, de modo que con magnesio, calcio, silicio, selenio y control mostró un rango de oscilación entre $8,36$ y $19,73 \text{ ng.rotífero}^{-1}$ donde el mínimo valor lo represento el control y el máximo el magnesio respectivamente; indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$). Cenizas generadas con hierro, cobre, azufre, zinc y control mostraron un contenido entre $9,56$ y $14,60 \text{ ng.rotífero}^{-1}$ donde el mínimo valor es representado por el control y el máximo por el azufre existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre el cobre y el hierro (*figura 5b* y *tabla 2*).

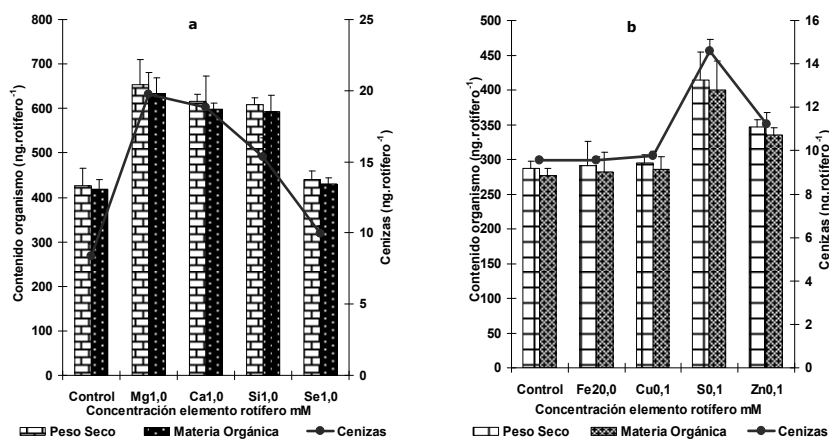


Figura 5.- Contenido organismo: peso seco, materia orgánica y cenizas (ng.rotífero^{-1}) respecto a la concentración de elementos en *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo: **(a)** Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} **(b)** Fe^{3+} , Cu^{2+} , S^{2-} , Zn^{2+} . Media \pm SD ($n=3$).

La incorporación independiente de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} y Cu^{2+} por *Brachionus plicatilis* vía *Phaeodactylum tricornutum* se puede observar en la *figura 6 a-b* y *tablas 3-4*; donde las cantidades de incorporación en el rotífero fueron muy variables lo que nos indicó la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones ($p<0,05$), *tablas 3-4*. Tales diferencias concuerdan con los valores de cenizas en el rotífero reportados en todas las condiciones elementales, que además son evidentes en el comportamiento del peso seco y orgánico del rotífero vía el alimento.

Existe poca información sobre la composición mineral de los rotíferos así mismo sobre el efecto de la dieta sobre esta, pero algunos resultados sugieren que alimentar rotíferos con *Nannochloropsis* sp incrementa ligeramente su contenido de sodio, potasio, zinc, cobre y manganeso (Watanabe *et al.*, 1983). Ferreira, 2006 enriqueciendo rotíferos en periodos de 8

días menciona que dependiendo de la microalga empleada será el grado de acumulación de diferentes minerales, además de que el contenido de estos tiende a incrementarse en la medida en que se aumenta la tasa de renovación en cultivos en semicontinuo. Normalmente poca atención se ha prestado a la nutrición mineral de organismos acuáticos, algunos autores no lo consideran un factor determinante del valor nutritivo de la dieta (Watanabe *et al.*, 1983). Sin embargo Robin, 1989 consiguió incrementar el crecimiento del rodaballo enriqueciendo rotíferos con una mezcla de minerales. La forma y concentración en la que se suministra un determinado elemento dada su importancia en procesos fisiológicos, metamórficos y de supervivencia es de crucial importancia en su bioacumulación a través de la cadena trófica. Ferreira, 2006 menciona en su disertación que es de relevante importancia tener en cuenta la biodisponibilidad de los elementos traza en el momento de formular los medios nutritivos ya que puede ser importante para mejorar la composición bioquímica de los organismos que forman parte de la cadena nutritiva en acuicultura, como resultado evidente en el presente estudio.

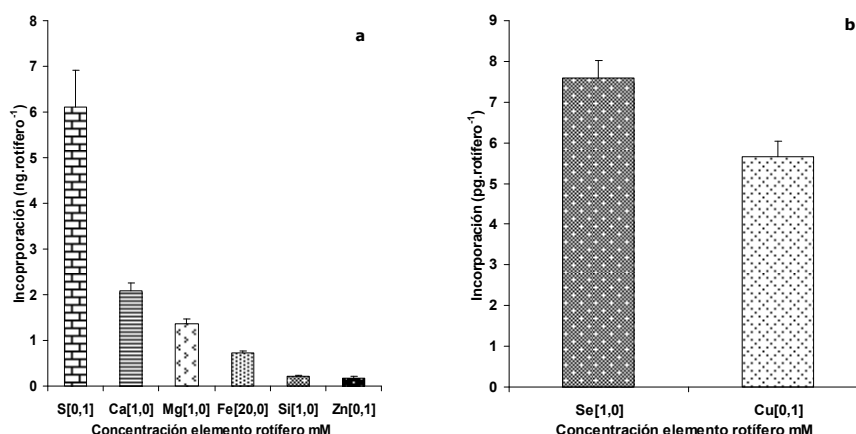


Figura 6.-Incorporación de elementos en *Brachionus plicatilis* alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* enriquecida con: **(a)** S^{2-} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Si^{4+} , Zn^{2+} **(b)** Se^{2-} , Cu^{2+} . Media \pm SD ($n=3$)

El contenido de ácidos grasos en *Brachionus plicatilis* mostró la misma tendencia que *Phaeodactylum tricornutum* (Frolov *et al.*, 1991; Robin, 1995; Shin *et al.*, 2008), cultivada con diferentes concentraciones de elementos; donde los ácidos grasos (AG) más abundantes entre un 6 y 36% están representados por el 14:0, 16:0 y el 16:1(n-7), estimándose en conjunto en un 58,8-69,26% del total. Otros AG monoinsaturados y poliinsaturados de cadena corta entre un 2 y 7% son el 16:3(n-3), 18:0, 18:1(n-9), 18:1(n-7), 18:2(n-6) y 20:0; en tanto ácidos grasos con más de 20 carbonos que representan un rango de 0,5-10,5% son el 20:4(n-6), 20:5(n-3), 22:5(n-3) y 22:6(n-3). Destacar que el ácido graso 22:5(n-3) no aparecía como detectable en la biomasa microalgal.

Cada elemento en el rotífero con la concentración ya descrita vía *Phaeodactylum tricornutum*, mostró diversos grados de evolución respecto a incrementar o decrecer porcentualmente tales AG. Siendo un hecho que en base a la concentración del ácido palmítico (16:0) y palmitoleico (16:1(n-7)) fue posible la elongación y desaturación de la cadena de carbonos de los ácidos grasos vía dos sistemas enzimáticos como la *acetyl-coA* y

ácido graso sintetasa (Huang *et al.*,2010) bondad característica de los rotíferos los cuales pueden sintetizar otros ácidos grasos *de novo* de cadena más larga, importantes y de concentración apreciable en el rotífero (Lubzens *et al.*,1985; Gurr *et al.*,2002; Shin *et al.*,2008), como lo fueron el 16:3(n-3), 18:0, 18:1(n-9), 18:1(n-7), 18:2(n-6), y 20:0 que originaron series de otros AG insaturados de cadena aun más larga como el 20:5(n-3), 22:5(n-3) y 22:6(n-3) (tabla 5-6). Reitan *et al.*,1993 demostraron una mejoría significativa en el crecimiento, supervivencia y viabilidad de larvas de rodaballo a la metamorfosis, por la adición de determinadas microalgas ricas en ácidos grasos altamente poliinsaturados (PUFAs) a rotíferos. Sugiriendo que las microalgas contribuyen a la mejoría de los lípidos, especialmente el EPA y DHA, y el contenido en proteínas de los rotíferos (Øie *et al.*,1997) ya que los rotíferos por naturaleza son pobres en los requerimientos de PUFAs para estadios larvales tempranos (Bell *et al.*,2003). En el presente estudio destaca por su concentración el ácido graso eicosapentaenoico (Dunstan *et al.*,1994; Ying *et al.*,2000) como precursor de eicosanoides (Dyeberg, 1986) en larvas tempranas de organismos marinos, el cual fue acumulado en mayor concentración en todos los elementos probados con respecto al control con los siguientes valores Mg^{2+} (8,73%), Ca^{2+} (8,99%), Si^{4+} (9,73%), Se^{2-} (9,02%), Control(7,17%) en tanto que con Fe^{3+} (8,66%), S^{2-} (10,52%), Zn^{2+} (8,09%), Cu^{2+} (9,27%), Control(6,14%) indicándonos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$), tablas 5-6. Los valores de EPA según la concentración de los elementos evaluados en el presente estudio, se encuentran por debajo de lo reportado por Frolov *et al.*,1991 alimentando rotíferos con *P. tricornutum* los cuales mencionan obtener un 17,59% de EPA. Sin embargo Ying *et al.*,2000 menciona un rango de entre 6,5 y 19,5 % rango dentro de el cual caen nuestros resultados (tabla 5-6); mencionando tales autores que la existencia de diversas cepas o líneas de la especie y diversidad de sitios de donde han sido aisladas, así como la constitución del medio de cultivo trae consigo una gran variabilidad de sus lípidos totales así mismo los AG totales. Ácidos grasos como el 22:5(n-3) y 22:6(n-3) aparecen en la cuantificación de AG importantes debido a los procesos enzimáticos antes descritos; y como reflejo de la calidad de los lípidos de la microalga. Frolov *et al.*,1991 mencionan que la aparición y concentraciones de los anteriores AG en el rotífero son debidas a los periodos de alimentación encontrando estos autores un comportamiento lineal. Los ácidos grasos pueden proveer de información sobre el tipo y calidad de dieta ingerida (Dalsgaard *et al.*,2003). Matsumoto *et al.*,2009 mencionan que la inclusión de determinadas cantidades zinc así como de otros elementos traza influyen sobre la riqueza de ácidos grasos de la microalga *Chlorella* que influye a su vez sobre la calidad del rotífero el cual además funciona como un vehículo para que el zinc cubra los requerimientos funcionales de larvas de peces marinos así como supervivencia (Hamre *et al.*,2008) con elementos como el yodo y selenio los cuales incrementan la concentración de los ácidos grasos en el rotífero. Johnston *et al.*,2008 indican la importancia de la nutrición mineral de elementos como el calcio, cobalto, cobre, hierro, magnesio, manganeso, zinc, en todo el ciclo biológico de peces marinos sobre la calidad de huevos vía la vitelogenina lo que produce huevos con mejores perfiles de PUFAs.

El contenido de AGT ng.rotífero⁻¹ que correspondió, del contenido lipídico de *Brachionus plicatilis* alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* por elemento fue el siguiente: Mg²⁺(23,42%), Ca²⁺(32,19%), Si⁴⁺(27,70%), Se²⁻(31,30%), Control(23,65%) en tanto que con Fe³⁺(68,21%), S²⁻(26,96%), Zn²⁺(26,16%), Cu²⁺(61,83%), Control(35,29%). Respecto a tales porcentajes autores como Teshima *et al.*,1987; Frolov *et al.*,1991; Nagata and White, 1992; Fernández-Reiriz *et al.*,1993; Rainuzzo *et al.*,1997; Lubzens *et al.*,2001, mencionan que cerca del 34-43% de los lípidos en rotíferos son fosfolípidos y un 20-55% son triacilglicerol, con pequeñas concentraciones de monoacilglicerol, diacilglicerol, esterol, esterol esterol, y ácidos grasos libres. Los fosfolípidos y triacilglicerol muestran similares perfiles de ácidos grasos, pero estos son grandemente afectados por los lípidos proveídos en la alimentación del rotífero. Es en base a nuestros resultados que observamos cuan importante y variable resulta ser la inclusión de diferentes elementos en la modificación del perfil bioquímico en la cadena trófica.

Se observaron importantes diferencias en la evolución porcentual y ng.rotífero⁻¹ de los ácidos grasos saturados (AGS) mas los monoinsaturados (AGM) con respecto a los poliinsaturados (AGP), indicándonos la existencia en los dos casos, de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto al control ($p<0,05$), figuras 7 a-b y tablas 5-6.

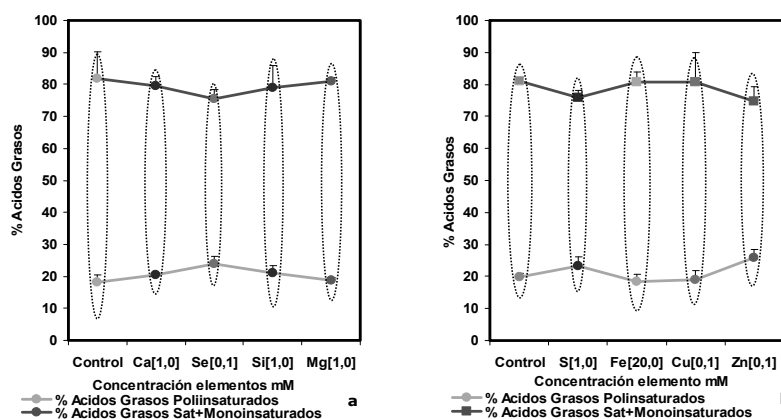


Figura 7.- Evolución porcentual del contenido de ácidos grasos en *Brachionus plicatilis* alimentado con *P. tricornutum* en cultivo semicontinuo con: **(a)** Ca²⁺, Se²⁻, Si⁴⁺, Mg²⁺, **(b)** S²⁻, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺. Media \pm SD ($n=3$)

Dentro del grupo de los ácidos grasos poliinsaturados se encuentran tres grandes familias, mediante las cuales se derivan los procesos de elongación a ácidos grasos de cadena larga como son la **serie ω -9, ω -6 y ω -3**; de los cuales las series importantes son la ω -3 y ω -6, así mismo la proporción entre estas dos series es de relevante importancia en el valor energético en cada uno de los niveles tróficos, aspecto que se ha descuidado en la nutrición de organismos marinos (Estévez *et al.*,1999), por lo que una mayor proporción de los ω -3 en la cadena trófica es imprescindible en efectivos mecanismos formadores de membrana durante la metamorfosis de organismos marinos (Reitan *et al.*,1994; Estévez and Kanazawa, 1995). Es así que las proporciones de ácidos grasos **ω -3: ω -6** por rotífero mostraron diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación con respecto al control ($p<0,05$) ver tablas 5 y 6. La proporción porcentual

de los AG ω -3: ω -6 en los elementos estudiados se encontró entre 2,24:1 y 4,32:1 (tabla 5-6).

Un aspecto importante desde el punto de vista nutricional en niveles superiores de la trama trófica alimenticia; es la proporción que existe del total de los ácidos grasos, el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3 EPA) y el ácido araquidónico (20:4n-6 ARA), tal proporción EPA:ARA es muy importante en la alimentación de las primeras etapas de desarrollo larval.

En los peces planos, la metamorfosis y el desarrollo de la pigmentación son controlados a nivel nervioso y neuroendocrinológico. En consecuencia, la producción anormal de eicosanoides en el cerebro como resultado de la alteración de los niveles de ARA y EPA trae consigo graves consecuencias para el desarrollo y la metamorfosis de las larvas de peces planos, incluyendo su anormal pigmentación; por lo que la proporción de EPA que promueve la formación de membranas a nivel celular sobre la proporción de ARA deberá ser siempre superior (Estévez *et al.*,1999).

En *Brachionus plicatilis* la inclusión de diferentes concentraciones de Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} mediante la microalga *Phaeodactylum tricornutum* logramos modificar tales proporciones en el rango de 7,79:1% al 19,98:1% como se puede observar en las tablas 5-6 existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto a el control ($p<0,05$); resultados que superan los descritos por Frolov *et al.*,1991 encontrando una proporción de 3,09:1%. Sargent *et al.*,1999; Estévez *et al.*,2001; Bell *et al.*,2003 sugieren que una normal supervivencia, crecimiento, pigmentación y metamorfosis se logra cuando el alimento vivo posee una relación EPA:ARA de 4,1-4,2:1 y también con una proporción de EPA:ARA tan alta como 20:1; sin embargo relaciones entre 1,5:1, 0,4:1 y 0,3:1 son insuficientes para el correcto desarrollo larval. Relaciones descritas en la presente disertación cubren eficientemente tales necesidades mediante los rotíferos modificados por la alimentación con diferentes concentraciones de elementos, resultando que la adecuada nutrición mineral vía la cadena trófica resulta una excelente herramienta biotecnológica en la modificación del alimento vivo. Hamre *at al.*,2008 enriqueciendo rotíferos con una mezcla de yodo y selenio logro una proporción EPA:ARA de 7,2:1%, la cual fue superior en comparación con rotíferos sin enriquecer.

La diversidad de elementos y sus concentraciones ya conocidas de igual modo ejercieron efecto en la relación EPA:DHA la cual se encontró en un rango entre 5,38:1 y 9,08:1; indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto a el control ($p<0,05$) ver tablas 5-6.

En lo que respecta al ácido graso docosahexaenoico (22:6n-3 DHA) la concentración porcentual de este con respecto al total de ácidos grasos estuvo presente en el rotífero en el rango de 1,02 y 1,45% del total de ácidos grasos (tablas 5-6), la presencia de dicho AG obedeció a la desaturación y elongación del AG 22:5n-3 (docosapentaenoico) el cual mostró una mayor concentración respecto al de DHA en el rango de 1,03 al 2,34% (tablas 5-6). Frolov *et al.*,1991 en su estudio sobre la composición bioquímica de *Brachionus plicatilis* menciona valores muy inferiores al presente estudio con 0,20%.

En la actualidad, se ha prestado bastante atención a las investigaciones sobre la composición bioquímica y mineral de alimentos vivos, utilizados en la acuicultura, ya que el

cultivo exitoso de peces y numerosos invertebrados acuáticos depende en parte de la correspondencia de la calidad nutricional de la dieta con las necesidades nutricionales de los organismos cultivados. Entre las diversas especies de zooplancton, el rotífero *Brachionus plicatilis* es ampliamente utilizado como alimento vivo en la cría de las larvas de varios peces marinos y de agua dulce.

El conocimiento de las peculiaridades y los rangos de variación de la composición bioquímica de los organismos utilizados como alimento vivo vía la nutrición mineral es necesaria, a fin de elegir el método más apropiado para aumentar el valor nutritivo de los organismos cultivados. Una de las características bioquímicas más importantes a las que más atención se da en la elección de un alimento apropiado es la composición de ácidos grasos de los lípidos.

Artemia franciscana

La evolución de la tasa de alimentación de *Artemia franciscana* con *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo con diferentes elementos, desde metanauplio (1 Día Después de la Eclosión DDE) a preadulto (8-9 DDE), finalizando con el proceso de apareamiento (10-11 DDE) mostró un incremento en la ración alimenticia de $0,3 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$ a $6,0 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$ por organismo (figura 8 a-b) lo cual dependió de la transparencia del medio de cultivo, de esta manera todo el alimento adicionado diariamente fue ingerido por *Artemia* (Abreu-Grobois *et al.*, 1991; Sorgeloos *et al.*, 1994). Se observó entre el día 1 y 3 de cultivo una lenta filtración de la ración alimenticia, corroborada en el conteo celular y transparencia en el medio de cultivo. Tal comportamiento pudo ser debido por manipulación, causante de estrés del organismo, un factor más la ración alimenticia, la cual pudo haber sido excedida en esos tres primeros días de cultivo; al respecto D'Agostino, 1980; Patiño, 1995 recomiendan una ración alimenticia inicial de $25 \mu\text{g}$ de microalgas (peso seco x metanauplio de *Artemia*), aunque en el presente estudio se administro en el inicio entre 3,99 y $8,33 \mu\text{g}$ de microalgas por organismo debido al peso seco celular de *Phaeodactylum tricornutum* con diferentes elementos en cultivo (tablas 8-9), considerando lo descrito por Nimura 1963 el cual menciona que elevadas tasas de ingestión pueden retrasar el crecimiento de *Artemia*. Ulterior a este periodo (figura 8 a-b) la tasa de filtración de *Artemia franciscana* se incremento de forma casi lineal.

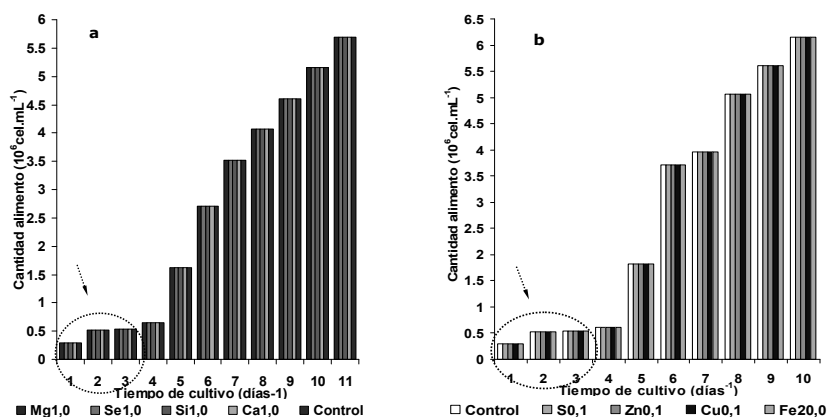


Figura 8.- Evolución del consumo ($10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) de *Phaeodactylum tricornutum* (cultivada con diferentes elementos) por *Artemia franciscana*: **(a)** Ca^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Mg^{2+} , **(b)** S^{2-} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} .

Respecto a la supervivencia de *Artemia* al T₁₁ alimentada con la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* enriquecida con magnesio, calcio, silicio y selenio, mostró diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto a el control ($p<0,05$) ver figura 9a; encontrándose en el rango entre el 66 y 83%. En tanto que con hierro, azufre, zinc y cobre al T₁₀ estuvo entre el 73 y 93% indicándonos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto a el control ($p<0,05$) ver figura 9b. Lora-Vilchis *et al.*,2004 con la diatomea *Chaetoceros gracilis* obtiene una supervivencia del 86%. En tanto que Seixas *et al.*,2009; Ronsón-Paulín *et al.*,2009 con diferentes microalgas obtienen porcentajes en torno al 18 y 88%. Por otra parte Dhont and Van Stappen, 2003 indican en diversos sistemas de cultivo en los mismos tiempos que el presente estudio, supervivencias en torno al 45 y 82%. Por otra parte Anh *et al.*,2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes al día 11 de cultivo mostró supervivencias entre 52 y 54%. La variabilidad en la supervivencia de *Artemia franciscana* dependió como se puede observar del enriquecimiento y calidad de la microalga con que fue alimentada, la cual además influyo en el tiempo en el cual *Artemia* llego a su etapa adulta (8-9 DDE) y con ella al apareamiento (10-11 DDE) del 100% de los adultos, donde las hembras ya poseían desarrollado el ovisaco. Anh *et al.*,2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes demostró al día 14 de cultivo una tasa de maduración entre el 95,2 y 99,7%.

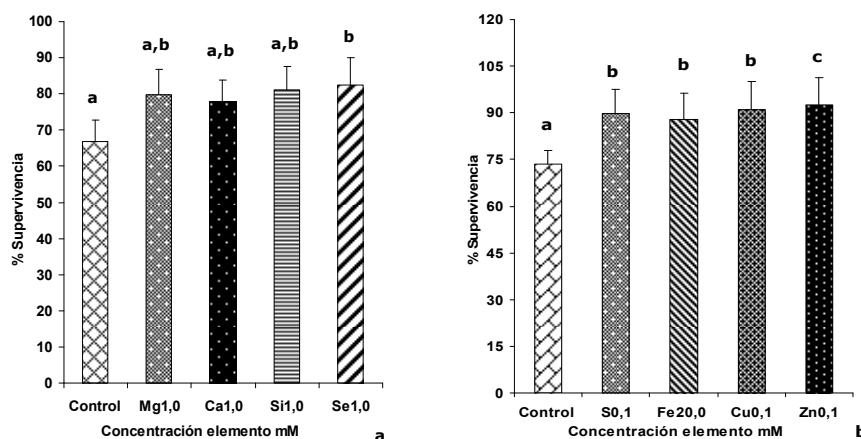


Figura 9.- Supervivencia de *Artemia franciscana* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* (cultivada y enriquecida con diferentes elementos): **(a)** Ca²⁺, Mg²⁺, Si⁴⁺, Se²⁻, **(b)** S²⁻, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$)

Por lo que se refiere a la longitud total (LT) alcanzada por los adultos de los diferentes tratamientos al T₁₁ se observó que con magnesio, calcio, silicio y selenio mostró un tamaño entre 6,16 y 6,81 mm⁻¹ por organismo indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto a el control ($p<0,05$) ver figura 10a. En cuanto a el hierro, azufre, zinc y cobre al T₁₀ la LT exhibió diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto a el control ($p<0,05$) ver figura 10b en el rango de los 6,04

y $9,33 \text{ mm}^{-1}$ por adulto de *Artemia*. Lora-Vilchis *et al.*, 2004 alimentando *Artemia* por 7 días con la diatomea *Chaetoceros gracilis* obtuvo tallas de solo $6,0 \text{ mm}^{-1}$. En tanto que Seixas *et al.*, 2009 alimentando con *Rhodomonas lens*, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana* y *Nannocloropsis gaditana* al T_8 obtuvo LT en torno a 1,5 y 4,9 mm. Por otra parte Anh *et al.*, 2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes demostró valores superiores a los nuestros pero al día 14 de cultivo, demostrando LT en el rango de 8,8 y 9,4 mm, en tanto que Ronsón-Paulín *et al.*, 2009 al día 14 de cultivo con *Tetraselmis suecica*, *Nannocloropsis* sp y mezcla de estas con y sin probióticos obtiene tallas entre 5,2 y 7,65 mm por individuo. Sin embargo Dhont and Van Stappen, 2003 citan que después de 2 semanas de cultivo con diferentes dietas vivas o inertes es posible que los preadultos o adultos de *Artemia* en promedio posean una longitud de 5 mm; nuestros resultados superan dichos valores al T_{10-11} . Fábregas *et al.*, 1996, 1998; Evjemo and Olsen, 1999, señalan que diferentes concentraciones de alimento influyen sobre el crecimiento y la reproducción de *Artemia franciscana*; en el presente estudio para todos los elementos probados, las tasas de alimentación fueron las mismas, alterando solo la calidad de la dieta vía el enriquecimiento con los diferentes elementos, lo que nos demostró que la variabilidad de tallas es reflejo de la diversidad en la nutrición mineral.

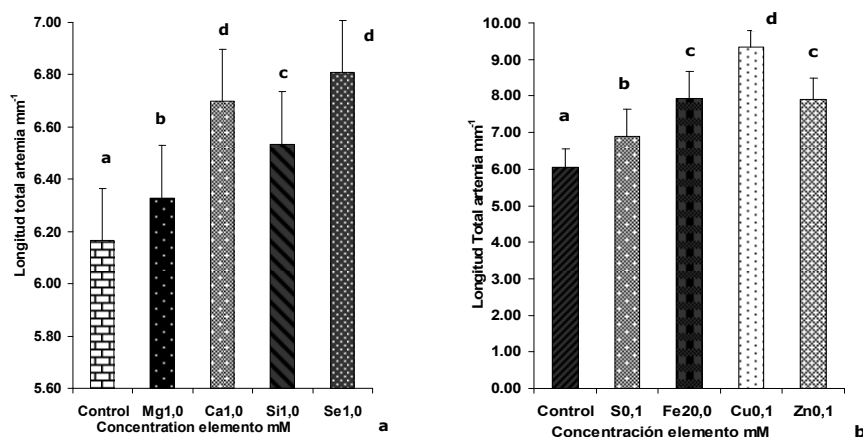


Figura 10.- Longitud total (mm) de *Artemia franciscana* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* (cultivada y enriquecida con diferentes elementos): **(a)** Ca^{2+} , Mg^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , **(b)** S^{2-} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} . Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$)

En lo que se refiere a la tasa de conversión alimenticia (TCA) y porcentaje de eficiencia de crecimiento (%EC), por *Artemia* al tiempo T_{10-11} , alimentadas con la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* enriquecida en las concentraciones de elementos ya conocidas, fue muy variable mostrando los siguientes valores : magnesio(3,45-29,01%), calcio(2,48-40,35%), silicio(2,75-36,31%), selenio(3,06-32,69%) y control(2,35-29,84%) indicándonos en ambos casos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p < 0,05$). En tanto que la TCA y %EC de *Artemia* con hierro, cobre, azufre y zinc con respecto al control fue (4,48-22,31%), (3,44-29,07%), (2,28-43,70%), (1,84-54,20%) y (2,43-41,11%) respectivamente, indicándonos en ambos casos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y

con respecto al control ($p < 0,05$). Los valores de TCA nos indican cuan eficiente es *Artemia* vía la microalga enriquecida con el elemento para ganar peso o crecer; Lora-Vilchis *et al.*, 2004 alimentando con la diatomea *Chaetoceros gracilis* obtiene TCA de 2,23 valores comparables en eficiencia con los demostrados en el presente estudio. Sin embargo Seixas *et al.*, 2009 alimentando con *Rhodomonas lens* y *Tetraselmis suecica* obtiene mayores TCA entre 6,5 y 6,2 respectivamente. El comportamiento de las anteriores variables nos da una idea de cuan importantes son ciertos elementos en la calidad del alimento vía la cadena trófica y su desempeño nutricional sobre variables operacionales de cultivo.

La calidad de *Phaeodactylum tricornutum* debida al enriquecimiento con diferentes elementos en concentraciones conocidas, demostró diferentes velocidades de crecimiento (VC) en *Artemia* (mm.día⁻¹): magnesio-0,57, calcio-0,61, silicio-0,59, selenio-0,62, control-0,56, demostrándonos la existencia de diferencias altamente significativas ($p = 0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p < 0,05$) excepto entre el control y el magnesio. En tanto que con hierro-0,72, cobre-0,84, zinc-0,72, azufre-0,63, control-0,54 la oscilación demostró la existencia de diferencias altamente significativas ($p = 0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p < 0,05$). Las mejores velocidades de crecimiento se obtuvieron con hierro, cobre y zinc. Lora-Vilchis *et al.*, 2004 en su estudio sobre la tasa de crecimiento en *Artemia* con diferentes dietas obtiene con la diatomea *Chaetoceros gracilis* velocidades de crecimiento muy cercanas a nuestros resultados en el rango de 0,44 y 0,56 mm.día⁻¹. Sick 1976 indica que altas VC en *Artemia* alimentada con *Dunaliella viridis* son debidas a la ausencia de pared celular y al alto contenido de proteína celular y contenido energético sin embargo *Phaeodactylum tricornutum* posee una pared celular rígida lo que nos muestra que esta y las anteriores características no son las únicas razones por las cuales el alto valor alimenticio de una microalga, debiéndose agregar que en el presente estudio el enriquecimiento mineral de la dieta es un factor más el cual influye en el valor alimenticio de la dieta y por ende en el siguiente nivel trófico.

El peso seco ganado por los adultos de *Artemia franciscana* en base al elemento en la alimentación fue muy variable de modo que con magnesio, calcio, silicio, selenio y control osciló al T₁₁ en el rango de 139,19 y 261,41 µg.artemia⁻¹ (tabla 8), por otra parte con hierro, cobre, azufre, zinc y control al T₁₀ oscilo entre 173,72 y 348,16 µg.artemia⁻¹ (tabla 9); indicándonos en todos los casos la existencia de diferencias altamente significativas ($p = 0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p < 0,05$). Tales valores de peso seco, se corresponden con la evolución de el peso orgánico (proteínas+lípidos+carbohidratos µg.artemia⁻¹) en el rango de 131,19-244,08 y 163,58-328,15 µg.artemia⁻¹ respectivamente; y por ende con el contenido de materia orgánica por adulto de *Artemia* (tablas 8-9). Lora-Vilchis *et al.*, 2004 alimentando *Artemia* con la diatomea *Chaetoceros gracilis* obtuvo al día 7 un peso orgánico de 252,9 µg.artemia⁻¹, Seixas *et al.*, 2009 alimentando con *Nannocloropsis gaditana*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* y *Rhodomonas lens* al T₈ obtuvo pesos entre 25,7 y 111,2 µg.artemia⁻¹. Por otra parte Anh *et al.*, 2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes al día 5 de cultivo obtiene pesos entre 310 y 320 µg.artemia⁻¹. Ronsón-Paulín *et al.*, 2009 al día 14 de cultivo con *Tetraselmis suecica*,

Nannocloropsis sp y mezcla de estas con y sin probióticos obtiene pesos entre 140 y 470 $\mu\text{g} \cdot \text{artemia}^{-1}$. Resultados que nos indican que la variabilidad en la calidad nutritiva de la microalga influyen en la nutrición y crecimiento del organismo; calidad nutricional que en nuestro estudio fue posible modificar vía el enriquecimiento mineral de la microalga lo que impacto en el desempeño nutricional de *Artemia* para la generación de peso.

En cuanto al contenido de cenizas por adulto de *Artemia* como se puede observar en la figura 11a y tabla 8 vario con respecto al enriquecimiento del elemento en *Phaeodactylum tricornutum*, de modo que con magnesio, calcio, silicio, selenio y control mostró un rango de oscilación entre 8,00 y 17,74 $\mu\text{g} \cdot \text{artemia}^{-1}$ donde el mínimo valor lo represento el control y el máximo el silicio respectivamente; indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$). Cenizas generadas con hierro, cobre, azufre, zinc y control mostraron un contenido entre 10,14 y 20,01 $\mu\text{g} \cdot \text{artemia}^{-1}$ donde el mínimo valor es representado por el control y el máximo por el zinc existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) (figura 10b y tabla 9). Dhont and Van Stappen, 2003 mencionan que diversos autores, citan en cultivos de *Artemia* adulta en condiciones de laboratorio porcentajes de cenizas en torno al 5 y 22% con diversos orígenes geográficos, así mismo Anh et al., 2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes indican valores que oscilan entre 15 y 16%. En el presente estudio nuestros resultados se citan en torno al 6 y 8%.

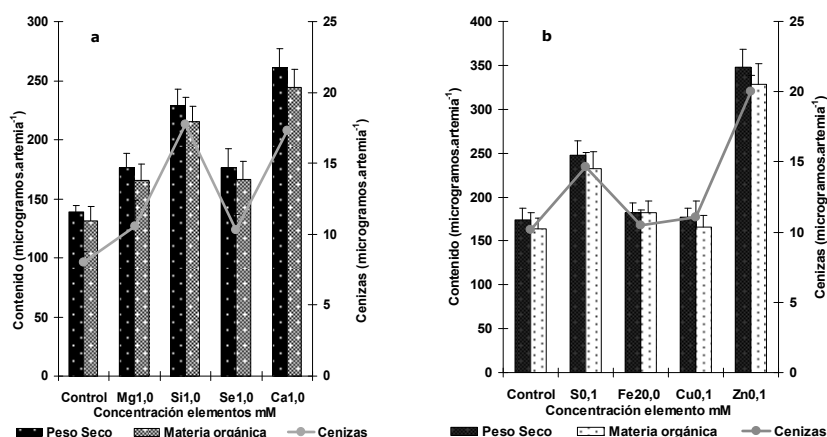


Figura 11.- Contenido organismo: peso seco, materia orgánica y cenizas ($\mu\text{g} \cdot \text{artemia}^{-1}$) respecto la concentración de elementos en *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo: **(a)** Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} **(b)** Fe^{3+} , Cu^{2+} , S^{2-} , Zn^{2+} . Media \pm SD ($n=3$).

La incorporación independiente de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} y Cu^{2+} por los adultos de *Artemia franciscana* vía *Phaeodactylum tricornutum* se puede observar en la figura 12 a-b y tablas 10-11; donde las cantidades de incorporación en *Artemia* en base al elemento fueron muy variables, lo que nos indica la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones ($p<0,05$), tablas 10-11. Tales diferencias concuerdan con la variabilidad de cenizas reportadas en todas las condiciones elementales,

que además son evidentes en el comportamiento del peso seco y orgánico de *Artemia* vía el alimento. Reinfelder *et al.*,1998, sugieren que la bioacumulación de un elemento se basa en modelos conceptuales sencillos en donde la concentración del elemento en el organismo esta controlada por el equilibrio entre el consumo, eliminación y crecimiento, tal y como ocurre en bivalvos, copepodos, rotíferos y *Artemia* (Wang and Fisher, 1998) y como vía de bioacumulación las microalgas (Lee and Luoma, 1998). La eficiencia de asimilación en los hidrobiontes es directamente proporcional al contenido citoplasmático del elemento en las células microalgales que sirven de alimento en copepodos y larvas de bivalvos (Reinfelder and Fisher, 1991;1994; Hutchins *et al.*,1995). La eficacia de *Artemia* como un transportador de bioproductos de importancia dietética en niveles superiores de la cadena trófica es posible, por ejemplo productos liposolubles administrados a través de una emulsión, compuestos solubles en agua a través de liposomas (Hontoria *et al.*,1994; Tonheim *et al.*,2000; Monroig *et al.*, 2003, 2006; Nordgreen *et al.*,2007) portador de microcápsulas (Sakamoto *et al.*,1982; Medina-Reyna *et al.*,2002a, b, c; Medina-Reyna *et al.*,2005); y como demuestra el presente estudio el transporte y bioacumulación indirecta o directa de elementos minerales importantes en marcados procesos fisiológicos y limitatorios de deformaciones esqueléticas en estadios tempranos y postlarvales de diferentes especies marinas (Nguyen *et al.*,2008). El enriquecimiento vía la cadena trófica incluso modifica la composición de ácidos grasos y supervivencia de larvas de pargo; lo que sería una importante herramienta biotecnológica a fin de mejorar la calidad de la cría larvaria de peces marinos en laboratorio. La utilidad del método de bioencapsulation por *Artemia* queda comprobada por su análisis químico.

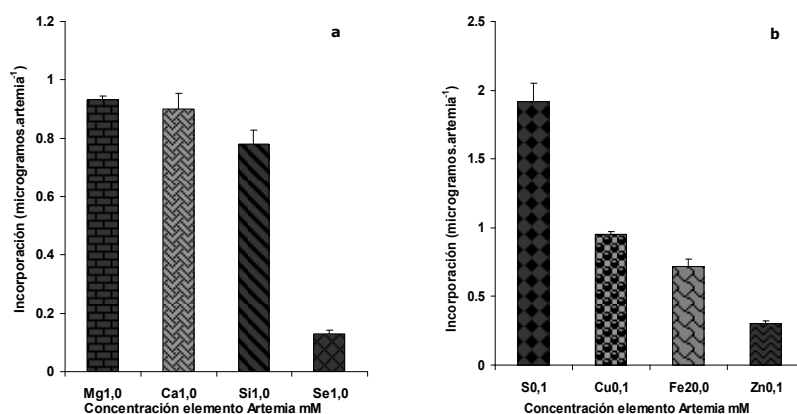


Figura 12.-Incorporación de elementos en *Artemia franciscana* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum*: **(a)** Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} **(b)** S^{2-} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} . Media \pm SD ($n=3$)

La inclusión de las concentraciones óptimas (capítulo 1) de magnesio, calcio, silicio, selenio, hierro, cobre, azufre y zinc con respecto a un control para la máxima generación de biomasa celular en *Phaeodactylum tricornutum* produjeron diferentes efectos como alimento en la composición bioquímica de *Artemia franciscana* de la siguiente manera: la biomasa

celular con magnesio, calcio, silicio y selenio mostró la siguiente disposición bioquímica **Proteínas>Carbohidratos>Lípidos**(pg.cel⁻¹), en tanto que en *Artemia* una vez consumida la microalga la disposición fue **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos**(μg.artemia⁻¹) en la mayoría de los casos (figura 13 a-b); en el caso de la biomasa celular con hierro, cobre, azufre y zinc reveló el siguiente orden en la composición proximal **Carbohidratos>Proteínas>Lípidos**(pg.cel⁻¹), y una vez consumida la microalga por *Artemia* **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos** (μg.artemia⁻¹) en la totalidad de los casos (figura 13 c-d).

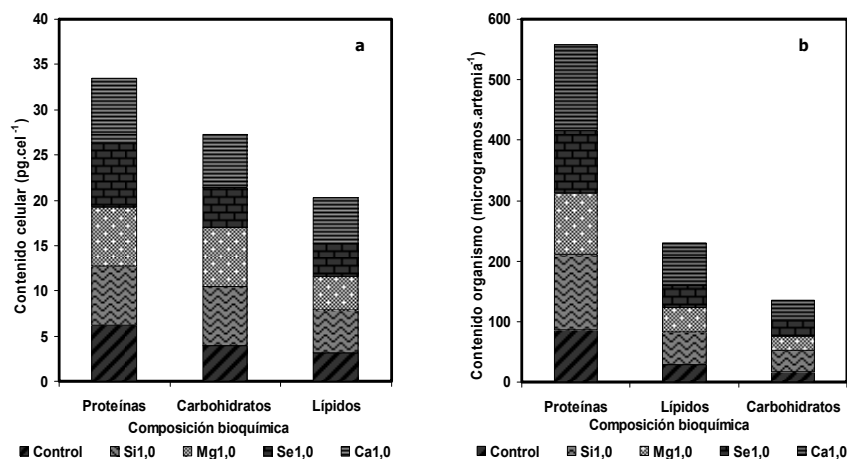


Figura 13.- Evolución de la composición bioquímica de *Phaeodactylum tricornutum* (pg.cel⁻¹) y de *Artemia franciscana* (μg.artemia⁻¹) con respecto a Si⁴⁺, Mg²⁺, Se²⁻, Ca²⁺ (a,b).

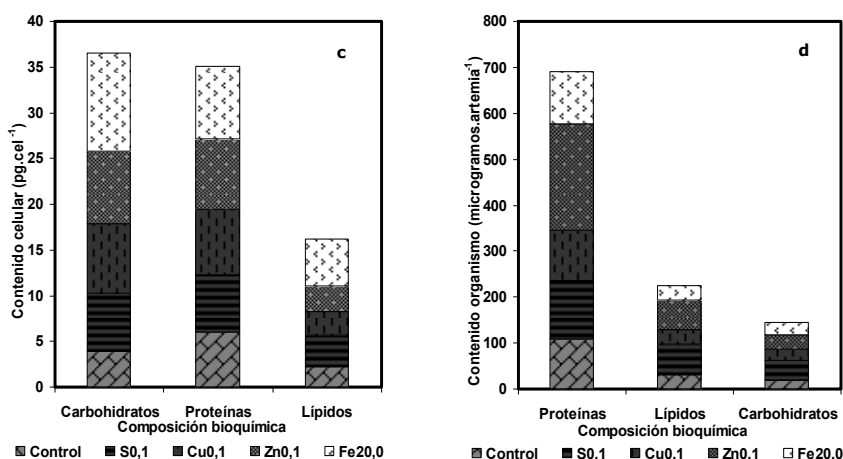


Figura 13.- Evolución de la composición bioquímica de *Phaeodactylum tricornutum* (pg.cel⁻¹) y de *Artemia franciscana* (μg.artemia⁻¹) con respecto a S²⁻, Cu²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺ (c,d).

En orden de importancia energética el contenido de proteína en *Artemia franciscana* fue el mayor combustible bioquímico (figura 13 b-d), una vez cultivada con la microalga y concentraciones conocidas de magnesio, calcio, silicio, selenio y control, mostrando los siguientes valores: 101,09, 141,21, 125,83, 103,26 y 85,79μg.artemia⁻¹ comparativamente;

existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$), ver *tabla 8*. Por lo que respecta al hierro, cobre, azufre, zinc y control se obtuvo 113,02, 109,70, 124,89, 232,02 y 110,25 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ respectivamente; existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) (*tabla 9*).

En tanto que el segundo combustible lo constituyó el contenido de lípidos (*figura 13 b-d*) que para el magnesio, calcio, silicio, selenio y control mostró 40,93, 68,76, 55,34, 36,91 y 27,94 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*tabla 8*), en tanto que para el hierro, cobre, azufre, zinc y control reveló valores de 32,31, 30,08, 66,98, 65,11 y 31,37 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*tabla 9*), indicando diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$).

Por lo que respecta a los carbohidratos (*figura 13 b-d*) valores de 23,78, 34,11, 34,31, 26,01 y 17,46 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ estuvieron presentes en magnesio, calcio, silicio, selenio y control comparativamente (*tabla 8*) así como 26,60, 26,17, 40,85, 31,02 y 20,96 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ en hierro, cobre, azufre, zinc y control; indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre el calcio y el silicio (*tabla 8*); y entre el hierro y cobre (*tabla 9*).

Cuando el contenido de proteína se considera como porcentaje de la fracción orgánica, el valor de proteína según la concentración del elemento probado fluctuó entre 54,12 y 70,70% *figura 14 a-b* y *tablas 8-9*. Seixas *et al.*, 2009 en juveniles de 5 días alimentados con *Tetraselmis suecica* y *Rhodomonas lens* obtuvieron entre un 63 y 68% respectivamente en tanto que Anh *et al.*, 2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes describe entre un 55 y 56%. Los valores del presente estudio superan a los descritos por Dhont and Van Stappen, 2003 para adultos de *Artemia* con un 39-67%. Los adultos de *Artemia* poseen una mayor cantidad de proteína que los nauplios dado por la dieta; así como un mayor contenido de los 10 principales aminoácidos esenciales que son considerados como necesarios por las larvas de peces.

Por lo que respecta a la fracción orgánica de los lípidos revelaron un rango de variación entre 18,13 y 28,41% *figura 14 a-b* y *tablas 8-9*. Zhukova *et al.*, 1998 indican que los porcentajes de asimilación de lípidos en *Artemia* responden a la variedad y calidad encontrada en la especie microalgal con que fue alimentada; en nuestro estudio tal calidad del alimento dependió de su enriquecimiento con diferentes elementos; *Phaeodactylum tricornutum* es rica en lípidos polares los cuales en *Artemia* después de una semana de alimentación pueden representar hasta un 52% del total de la composición lipídica. Seixas *et al.*, 2009 alimentando juveniles por 5 días con *Rhodomonas lens* y *Tetraselmis suecica* demuestra un contenido entre 12 y 15%, Anh *et al.*, 2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes obtiene porcentajes en torno al 14%, en tanto que Dhont and Van Stappen, 2003 citan que varios autores han descrito porcentajes lipídicos en adultos en torno al 4 y 31% y en carbohidratos obtienen entre un 4 y 20%, valores dentro de los cuales caen los resultados para esa fracción en el presente estudio con un comportamiento entre 9,45 y 17,32% *figura 14 a-b* y *tablas 8-9*. Anh *et al.*, 2009 reporta porcentajes entre un 14 y 15%.

Es así que la fracción orgánica hace más evidente la compartimentalización de los combustibles bioquímicos en *Artemia franciscana* además de ser evidente que la calidad del alimento vía la diversidad de elementos promovió la calidad proximal de *Artemia*. Es sabido además que la ración alimenticia afecta la tasa reproductiva de *Artemia* y su contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos.

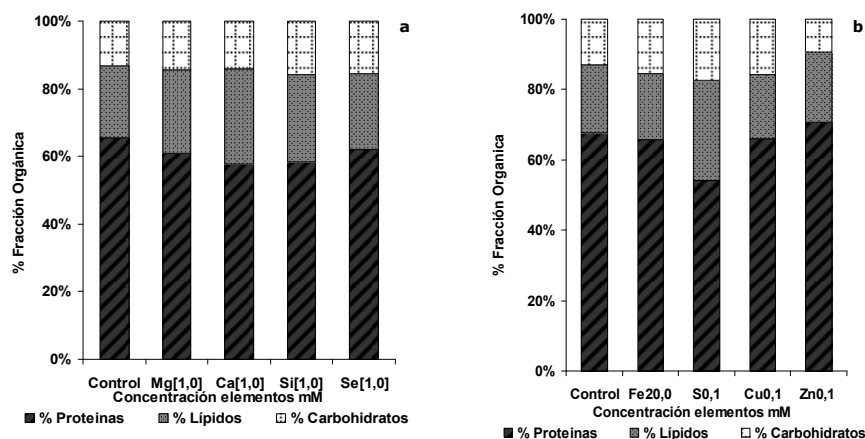


Figura 14.- Porcentaje de proteínas, lípidos y carbohidratos en *Artemia franciscana* respecto la concentración de elementos en *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo: **(a)** Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , **(b)** Fe^{3+} , S^{2-} , Cu^{2+} , Zn^{2+} .

En lo que concierne al valor calórico (VC) por *Artemia* en base a la calidad nutricional de *Phaeodactylum tricornutum* vía el magnesio, calcio, silicio, selenio y control mostró un rango de variación entre $3,46$ y $6,69 \times 10^{-6} J \cdot artemia^{-1}$ indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) (tabla 8); en tanto que vía el hierro, cobre, azufre, zinc y control manifestó una oscilación entre $4,26$ y $8,66 \times 10^{-6} J \cdot artemia^{-1}$ existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones ($p<0,05$) excepto entre el control y el cobre (tabla 9). Los valores aquí descritos de VC superan los referidos por Seixas *et al.*, 2009 en su estudio de alimentación con *Tetraselmis suecica* y *Rhodomonas lens* al T₅ con $1,16$ y $1,35 \times 10^{-6} J \cdot artemia^{-1}$. Demostrando nuestros resultados que la calidad del alimento de *Artemia* vía el enriquecimiento mineral en la microalga demuestra diversos grados de calidad de *Artemia* en cultivo.

En lo referente al contenido de ácidos grasos en *Artemia franciscana* este fue modulado por la calidad de *Phaeodactylum tricornutum* (Frolov *et al.*, 1991; Robin, 1995; Zhukova *et al.*, 1998) enriquecida con diferentes concentraciones de elementos (capítulo 1); donde los ácidos grasos (AG) más abundantes entre un 5 y 40% están representados por el 14:0, 16:0 y el 16:1(n-7), estimándose en conjunto en un 57,84-76,07% del total, resultados que superan los establecidos por Dhont and Van Stappen, 2003, con un 40-60%. Seixas *et al.*, 2009 mencionan que alimentando con diferentes microalgas el ácido graso saturado más abundante es el 16:0. Otros AG monoinsaturados y poliinsaturados en conjunto de cadena corta entre un 20,11 y 34,67% son el 16:2(n-6), 16:2(n-4), 16:3(n-3), 18:0, 18:1(n-9), 18:1(n-7), 18:2(n-6) (Léger *et al.*, 1986; Zhukova *et al.*, 1998); en tanto

ácidos grasos en conjunto, con más de 20 carbonos representan un rango de entre el 4,35 y 9,95% siendo el 20:4(n-6 AA), 20:5(n-3 EPA), 22:0 y 22:6(n-3 DHA). Donde el AG AA fue posible detectarlo entre un 0,13 y 0,76%, en tanto que Seixas *et al.*, 2009 alimentando con otras microalgas obtiene una concentración de solo el 0,4%. Destacar que el ácido graso 22:6(n-3) no aparecía como detectable en la biomasa microalgal al respecto Zhukova *et al.*, 1998 indica que el metabolismo de los lípidos en *Artemia* es poco conocido ya que se ha observado la capacidad de este microcrustáceo para poder sintetizar mayores cantidades *de novo* de 16:0 y 18:0 que los encontrados en la dieta y elongar a partir del 18:2(n-6) hacia ácidos grasos de cadena mas larga como ocurre con algunos crustáceos. Cada elemento en *Artemia franciscana* en la concentración ya descrita vía *Phaeodactylum tricornutum*, demostró diversos grados de evolución respecto a incrementar o decrecer porcentualmente tales AG.

En la presente disertación destaca por su concentración el ácido graso eicosapentaenoico (20:5(n-3) EPA) (Dunstan *et al.*, 1994; Ying *et al.*, 2000) que forma parte del equilibrio en la formación de eicosanoides (Dyeberg, 1986; Sargent *et al.*, 1993) en larvas tempranas de organismos marinos; los eicosanoides formados desde el EPA son menos activos biológicamente que los eicosanoides derivados de ARA, sin embargo el EPA es importante en la modulación de producción de eicosanoides por competir por los mismos sistemas enzimáticos que convierten ARA a eicosanoides (Sargent, 1995); así mismo contribuir en el equilibrio con el DHA a procesos de normal pigmentación. EPA fue acumulado en mayor concentración en todos los elementos probados con respecto al control con los siguientes valores Mg^{2+} (5,71%), Ca^{2+} (7,45%), Si^{4+} (4,96%), Se^{2-} (5,54%), Control(3,63%) en tanto que con Fe^{3+} (6,34%), S^{2-} (8,29%), Zn^{2+} (9,56%), Cu^{2+} (6,54%), Control(4,35%) indicándonos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$), ver *tablas 12-13*. Hamre and Harboe, 2008 en equilibrio con ARA y DHA y un 9% de EPA enriquecido en *Artemia* logra una normal pigmentación de larvas de *Hippoglossus hippoglossus*. Indicar que el contenido porcentual de EPA en la dieta enriquecida con los elementos y concentraciones ya descritas (capítulo 1); en la mayoría de los casos estuvieron por encima de los valores porcentuales encontrados en *Artemia* una vez alimentada (*tablas 12-13*) con dicha dieta; tal variación es debida a que este microcrustáceo posee una marcada propensión a retroconvertir ácidos grasos de cadena larga a corta (Evjemo *et al.*, 1997; Navarro *et al.*, 1999) tanto en cantidad como en calidad en función del tiempo de enriquecimiento o alimentación, lo que nos indicaría que los emplea en procesos de crecimiento y maduración sexual, que son indicativos de los valores ya descritos de TCA y %EC. Sin embargo a pesar de dichos procesos de desenlongación, son valores superiores a los descritos por Seixas *et al.*, 2009, los cuales alimentando con *Tetraselmis suecica* y *Rhodomonas lens* refieren valores de 4,2 y 6,5% de EPA.

El contenido de AGT $\mu g.artemia^{-1}$ que correspondió del contenido lipídico de *Artemia franciscana*, alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* enriquecida con cada elemento fue el siguiente: Mg^{2+} (94,50%), Ca^{2+} (55,48%), Si^{4+} (59,37%), Se^{2-} (60,52%), Control(57,52%) en tanto que con Fe^{3+} (87,33%), S^{2-} (57,78%), Zn^{2+} (68,53%), Cu^{2+} (97,87%), Control(60,92%). Bell *et al.*, 2003 mencionan que existen dificultades en el apropiado

enriquecimiento de *Artemia* con EPA y DHA lo que es un importante obstáculo para su idoneidad como presa viva en la alimentación de larvas de peces marinos. La pobre capacidad de enriquecimiento con EPA y DHA puede ser explicada por el alto contenido de lípidos libres antes y después del enriquecimiento especialmente triacilgliceroles, con pequeñas concentraciones de monoacilgliceroles, diacilgliceroles, esteroides, esteroides esteroides, y en particular ácidos grasos libres de escaso valor nutritivo (Takeuchi *et al.*,1992; McEvoy *et al.*,1996); que en el presente estudio fueron corregidos mediante la calidad y riqueza de fosfolípidos por el alimento con *Phaeodactylum tricornutum* enriquecido con diferentes elementos. Es en base a nuestros resultados que observamos cuan importante y variable resulta ser la inclusión de diferentes elementos en la modificación del perfil bioquímico en la cadena trófica. Dhont and Van Stappen, 2003; McEvoy *et al.*,1996 mencionan que los tiempos de enriquecimiento o crecimiento en *Artemia* influyen en la calidad y cantidad de los lípidos presentes variando de un 23 a un 17% los fosfolípidos y de un 58 a un 64% los triacilgliceroles, situación que nos explicaría la disminución del porcentaje de EPA en *Artemia* con respecto a la dieta.

Se observaron importantes diferencias con respecto a los diferentes elementos en la evolución porcentual y $\mu\text{g} \cdot \text{artemia}^{-1}$ de los ácidos grasos saturados (AGS entre un 18,72 y 51,15%) mas los monoinsaturados (AGM oscilando entre 38,12 y 70,74%) con respecto a los poliinsaturados (AGP fluctuando entre 9,11 y 14,13%), indicándonos la existencia en ambos grupos (AGS+AGM y AGP), de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto al control ($p<0,05$) (figura 15 a-b y tablas 12-13). Seixas *et al.*,2009 alimentando con diferentes microalgas demuestra valores de 35-38% de AGS, en tanto que en AGM 27-28% y en AGP un 35%.

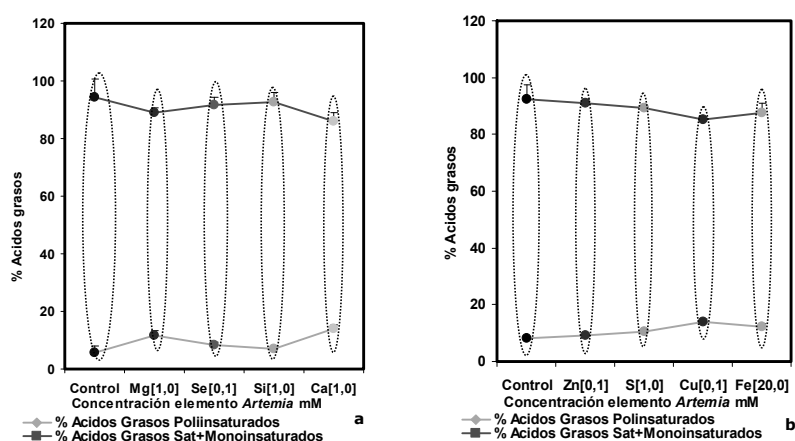


Figura 15.- Evolución porcentual del contenido de ácidos grasos en *Artemia franciscana* alimentado con *P. tricornutum* en cultivo semicontinuo con: **(a)** Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Ca^{2+} **(b)** Zn^{2+} , S^{2-} , Cu^{2+} , Fe^{3+} . Media \pm SD ($n=3$)

Los ácidos grasos poliinsaturados contienen tres grandes familias, mediante las cuales se derivan los procesos de elongación a ácidos grasos de cadena larga como son la **serie ω -9, ω -6 y ω -3**; de los cuales las series importantes son la ω -3 y ω -6, así mismo la proporción entre estas dos series es de relevante importancia en el valor energético en cada

uno de los niveles tróficos, aspecto que se ha descuidado en la nutrición de organismos marinos (Estévez *et al.*,1999), por lo que una mayor proporción de los ω -3 en la cadena trófica es imprescindible en efectivos mecanismos formadores de membrana durante la metamorfosis de organismos marinos (Reitan *et al.*,1994; Estévez and Kanazawa, 1995). Es así que las proporciones de ácidos grasos ω -3: ω -6 después del enriquecimiento en *Artemia franciscana* mostraron diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación con respecto al control ($p<0,05$) ver *tablas 12 y 13*. La proporción porcentual de los AG ω -3: ω -6 con los elementos estudiados se encontró entre 1,89:1 y 8,49:1 (*tabla 12-13*).

Un aspecto importante desde el punto de vista fisiológico y nutricional en niveles superiores de la trama trófica alimenticia; es la proporción que existe del total de los ácidos grasos, el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3 EPA) y el ácido araquidónico (20:4n-6 ARA), tal proporción EPA:ARA es muy importante en la alimentación de las primeras etapas de desarrollo larval; ya que son componentes importantes de las bicapas de fosfolípidos de las membranas celulares. Excesos en la producción de eicosanoides derivados de ARA en el cerebro o en la pituitaria alteran el control neuroendocrino de los procesos implicados en el desarrollo de la pigmentación durante la metamorfosis de organismos marinos especialmente larvas de peces.

En los peces planos, la metamorfosis y el desarrollo de la pigmentación son controlados a nivel nervioso y neuroendocrinológico. En consecuencia, la producción anormal de eicosanoides en el cerebro como resultado de la alteración de los niveles de ARA y EPA trae consigo graves consecuencias para el desarrollo y la metamorfosis de las larvas de peces planos, incluyendo su anormal pigmentación; por lo que la proporción de EPA que promueve la formación de membranas a nivel celular sobre la proporción de ARA deberá ser siempre superior (Estévez *et al.*,1999).

Resultado de nuestras investigaciones en *Artemia franciscana* la cual fue alimentada con la microalga *Phaeodactylum tricornutum* enriquecida con diferentes concentraciones de Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} y Se^{2-} es que logramos variar la proporción EPA:ARA en el rango de 5,72:1% al 43,92:1% como se puede observar en las *tablas 12 y 13* existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto a el control ($p<0,05$). Sargent *et al.*,1999; Copeman *et al.*,1999; Estévez *et al.*,2001; Bell *et al.*,2003 sugieren que una normal supervivencia, crecimiento, pigmentación y metamorfosis se logra cuando el alimento vivo posee una relación EPA:ARA de 4,1-4,2:1 y también con una proporción de EPA: ARA tan alta como 20:1; sin embargo relaciones entre 1,5:1, 0,4:1 y 0,3:1 son insuficientes para el correcto desarrollo larval. Relaciones descritas en la presente disertación cubren eficientemente tales necesidades mediante *Artemia franciscana* modificada por la alimentación con *Phaeodactylum tricornutum* enriquecida con diferentes concentraciones de elementos. Resultando que la adecuada nutrición mineral vía la cadena trófica resulta una excelente herramienta biotecnológica en la modificación del alimento vivo.

Actualmente, se esta prestando bastante atención a las investigaciones sobre la composición bioquímica y mineral de alimentos vivos, utilizados en la acuicultura, ya que el cultivo exitoso de peces y numerosos invertebrados acuáticos depende en parte de la

correspondencia de la calidad nutricional de la dieta con las necesidades nutricionales de los organismos cultivados. Entre las diversas especies de zooplancton, el microcrustáceo *Artemia franciscana* es necesariamente utilizado como el tercer eslabón alimenticio vivo en la cría de estadios tempranos de crustáceos y larvas de varios peces marinos y de agua dulce.

El conocimiento de las peculiaridades y los rangos de variación de la composición bioquímica de los organismos utilizados como alimento vivo vía la nutrición mineral es necesaria, a fin de elegir el método más apropiado para incrementar el valor nutritivo de los organismos cultivados. Una de las características bioquímicas más importantes a la que más atención se da en la elección de un alimento apropiado es la composición de ácidos grasos de los lípidos.

Tabla 1

**Cultivo del Rotífero *Brachionus plicatilis* alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* (cultivo semicontinuo) y elementos óptimos (modificado de Fábregas *et al.*, 1984).
Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹**

	Contro l	Silicio1,0mM	Selenio1,0mM	Calcio1,0mM	Magnesio1,0mM
Densidad celular (10⁶ cél.mL⁻¹ std)	48,75 ±0,92	55,85 ±2,65	54,75 ±4,47	51,87 ±2,08	50,51 ±1,35
Productividad (10⁹céls.L⁻¹.día⁻¹)	14,62 ±1,29	16,75 ±1,53	16,42 ±0,97	15,56 ±1,37	15,15 ±1,59
F.O. celular					
%proteína en F.O.	39,15	30,51	31,52	31,05	36,62
% carboh. en F.O.	29,50	41,99	38,17	39,07	31,59
% lípidos en F.O.	31,35	27,49	30,31	29,87	31,79
F.O. Rotífero					
%proteína en F.O.	51,88	41,69	50,83	51,59	40,18
% carboh. en F.O.	16,63	19,38	17,87	20,05	19,97
% lípidos en F.O.	31,48	38,93	31,30	28,36	39,85
Proteínas (pg.célula⁻¹ ± std)	5,24 ±0,30	5,27 ±0,52	5,31 ±0,19	5,47 ±0,37	6,24 ±0,60
Carbohidratos (pg.célula⁻¹ ± std)	3,95 ±0,36	7,25 ±0,21	6,44 ±0,52	6,88 ±0,35	5,38 ±0,19
Lípidos (pg.célula⁻¹ ± std)	4,19 ±0,15	4,75 ±0,41	5,11 ±0,12	5,26 ±0,44	5,42 ±0,25
P. orgánico(pg.cel⁻¹)	13,39	17,27	16,86	17,60	17,04
Proteínas (ng.rotífero⁻¹±std)	217,1a ±2,02	247,6bc ±2,41	218,9ab ±1,18	308,6d ±2,22	254,9cd ±0,99
Carbohidratos (ng.rotífero⁻¹±std)	69,6a ±2,67	115,1c ±4,18	76,9b ±2,35	119,9d ±1,38	126,7e ±1,67
Lípidos (ng.rotífero⁻¹±std)	131,4a ±9,07	230,9d ±8,43	134,6b ±5,33	169,7c ±16,88	252,7e ±14,51
Peso orgánico (ng.rotífero⁻¹)	418,08	593,58	430,58	598,13	634,32
Valor calórico (10⁻⁷ J.célula⁻¹)	3,59	4,37	4,39	4,56	4,55
Valor calórico (10⁻⁷ J.rotífero⁻¹)	115,9a	170,5d	118,9b	161,5c	182,9e
Peso seco (µg.mL⁻¹ ±std)	369,86 ±1,47	520,07 ±16,8	474,70 ±2,52	591,67 ±30,67	591,63 ±30,67
Peso seco (pg.cel⁻¹ ±std)	15,71 ±1,76	21,02 ±1,59	20,87 ±1,13	21,84 ±1,25	20,96 ±2,10
Peso seco (ng.rotífero⁻¹±std)	426,6a ±38,36	608,9c ±15,29	440,6b ±19,07	616,9d ±15,10	654,0e ±55,76
Cenizas (pg.cel⁻¹ ±std)	2,32 ±0,18	3,75 ±0,25	4,01 ±0,60	4,24 ±0,32	3,92 ±0,18
Cenizas (ng.rotífero⁻¹±std)	8,4a ±0,85	15,3c ±1,35	9,9b ±0,55	18,8d ±2,19	19,7e ±1,53
Materia Orgánica (pg.cel⁻¹ ±std)	13,35 ±0,91	21,02 ±1,34	16,86 ±1,47	17,60 ±0,93	14,90 ±1,74
Materia Orgánica (ng.rotífero⁻¹±std)	417,4a ±51,83	591,3c ±35,64	429,1b ±12,62	596,7c ±13,73	635,6d ±35,59
DensidadT₈ (rotíferos.mL⁻¹± std)	137,7a ±12,79	173,7d ±14,79	207,0e ±18,23	144,7b ±11,06	148,0c ±15,09
DensidadT₈ (huevos.mL⁻¹)	80,0b ±5,56	190,3e ±16,82	83,3c ±4,70	55,3a ±1,15	118,7d ±12,47
Q_N celular (pg)	8,45 ±0,76	8,64 ±0,73	8,32 ±0,72	8,97 ±0,33	9,05 ±0,23
Q_C celular (pg)	67,35 ±4,76	77,52 ±7,42	72,09 ±6,13	81,13 ±6,86	78,63 ±1,81
RelaciónC:N(átomos)	6,83	7,69	7,43	7,75	7,45

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

Tabla 2
Cultivo del Rotífero *Brachionus plicatilis* alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* (cultivo semicontinuo) y elementos óptimos (modificado de Fabregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹

	Control	Azufre0,1mM	Zinc0,1mM	Cobre0,1mM	Hierro20,0mM
Densidad celular (10 ⁶ cél.mL ⁻¹ std)	46,79 ±3,15	55,30 ±4,63	52,50 ±5,25	48,12 ±3,85	55,19 ±4,26
Productividad (10 ⁹ céls.L ⁻¹ .día ⁻¹)	14,04 ±1,23	16,59 ±0,91	15,75 ±1,38	14,44 ±1,46	16,56 ±1,71
F.O. celular					
%proteína en F.O.	39,93	36,76	36,51	36,97	37,72
% carboh. en F.O.	29,52	32,85	38,01	36,91	33,54
% lípidos en F.O.	30,55	30,39	25,48	26,12	28,73
F.O. Rotífero					
%proteína en F.O.	55,89	50,58	51,34	55,89	55,23
% carboh. en F.O.	17,64	21,58	19,64	17,90	18,40
% lípidos en F.O.	26,47	27,84	29,02	26,21	26,37
Proteínas (pg.célula⁻¹ ± std)	5,34 ±0,60	7,97 ±0,18	6,12 ±0,14	4,98 ±0,18	5,91 ±0,13
Carbohidratos (pg.célula⁻¹ ± std)	3,95 ±0,63	7,95 ±0,41	6,37 ±0,20	4,45 ±0,15	5,26 ±0,20
Lípidos (pg.célula⁻¹ ± std)	4,09 ±0,35	5,62 ±0,32	4,27 ±0,58	4,12 ±0,13	4,50 ±0,62
P. orgánico (pg.cel⁻¹)	13,38	21,55	16,76	13,55	15,67
Proteínas (ng.rotífero⁻¹±std)	154,9a ±10,22	202,3c ±21,24	172,1bc ±14,47	159,4ab ±15,67	155,5a ±13,93
Carbohidratos (ng.rotífero⁻¹±std)	48,9a ±0,51	86,3c ±1,77	65,8bc ±6,84	51,1a ±2,37	51,8ab ±6,72
Lípidos (ng.rotífero⁻¹±std)	73,4a ±5,57	111,4c ±6,29	97,3bc ±6,92	74,8ab ±3,17	74,2a ±2,75
P. orgánico (ng.rot⁻¹)	277,22	400,00	335,32	285,30	281,56
Valor calórico (10⁻⁷ J.célula⁻¹)	3,57	3,58	4,24	5,49	4,09
Valor calórico (10⁻⁷ J.rotífero⁻¹)	74,5a	107,2c	91,0b	76,5a	75,5a
Peso seco (µg.mL⁻¹ ±std)	894,43 ±34,35	1124,37 ±7,34	1014,27 ±115,03	1100,80 ±16,27	1109,57 ±42,92
Peso seco (pg.cel⁻¹ ±std)	15,77 ±0,73	25,63 ±1,34	20,05 ±2,12	16,02 ±1,29	18,51 ±1,78
Peso seco (ng.rotífero⁻¹±std)	286,8a ±10,59	414,6d ±20,51	346,5c ±10,90	295,1b ±11,68	291,1b ±34,32
Cenizas (pg.cel⁻¹ ±std)	2,39 ±0,11	4,08 ±0,10	3,30 ±0,17	2,47 ±0,18	2,84 ±0,20
Cenizas (ng.rotífero⁻¹±std)	9,6a ±1,02	14,6c ±0,55	11,2b ±0,54	9,7a ±0,24	9,6a ±0,14
Materia Orgánica (pg.cel⁻¹ ±std)	13,38 ±0,62	21,55 ±0,10	16,75 ±1,91	13,55 ±1,18	15,67 ±0,52
Materia Orgánica (ng.rotífero⁻¹±std)	276,3a ±10,29	399,8d ±19,38	334,3c ±14,38	285,1b ±19,23	281,7b ±29,02
DensidadT₈ (rotíferos.mL⁻¹± std)	211,3a ±18,93	310,0d ±27,87	292,3c ±28,01	313,0d ±38,16	253,0b ±32,05
DensidadT₈ (huevos.mL⁻¹)	45,3a ±3,79	82,7c ±9,22	75,0b ±5,29	119,0e ±8,72	84,3d ±9,66
Q_N celular (pg)	9,58 ±0,64	11,21 ±0,27	10,18 ±0,44	11,30 ±0,24	10,66 ±0,24
Q_C celular (pg)	69,94 ±5,15	77,65 ±3,00	72,38 ±2,12	80,04 ±0,84	76,66 ±1,09
RelaciónC:N(átomos)	5,94	6,26	6,10	6,07	6,16

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

<div> <div>Tabla 3</div> <div>Absorción atómica de elementos en <i>Brachionus plicatilis</i> alimentado con <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (cultivo semicontinuo) y elementos en concentraciones óptimas (modificado de Fabregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹</div> </div>			
Absorción Atómica	Rotífero sin Adición elemento	Absorción Atómica	Rotífero con Adición elemento
Mg [0] mM (ng.rotífero ⁻¹)	0,92a ±0,09	Mg[1,0] mM (ng.rotífero ⁻¹)	1,36b ±0,09
Mg [0] mM (pg.cél ⁻¹)	0,13 ±0,01	Mg[1,0] mM (pg.cél ⁻¹)	0,43 ±0,01
Se [0] mM (pg.rotífero ⁻¹)	5,4a ±0,10	Se[1,0] mM (pg.rotífero ⁻¹)	7,6b ±0,40
Se[0] mM (fg.cél ⁻¹)	1,0 ±0,03	Se[1,0] mM (fg.cél ⁻¹)	4,9 ±0,10
Si[0] mM (ng.rotífero ⁻¹)	0,14a ±0,01	Si[1,0] mM (ng.rotífero ⁻¹)	0,21b ±0,006
Si[0] mM (fg.cél ⁻¹)	3,5 ±0,20	Si[1,0] mM (fg.cél ⁻¹)	5,2 ±0,29
Ca[0] mM (ng.rotífero ⁻¹)	1,43a 0,13	Ca[1,0] mM (ng.rotífero ⁻¹)	2,07b ±0,18
Ca[0] mM (pg.cél ⁻¹)	0,76 ±0,054	Ca[1,0] mM (pg.cél ⁻¹)	2,39 ±0,29
Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0,05).			

Tabla 4				
Absorción atómica de elementos en <i>Brachionus plicatilis</i> alimentado con <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (cultivo semicontinuo) y elementos en concentraciones óptimas (modificado de Fabregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día ⁻¹				
Absorción Atómica	Rotífero sin Adición elemento	Absorción Atómica	Rotífero con Adición elemento	
Zn[0] mM (ng.rotífero ⁻¹)	0,12a ±0,016	Zn[0,1] mM (ng.rotífero ⁻¹)	0,17b ±0,01	
Zn[0] mM (fg.cél ⁻¹)	6,1 ±0,04	Zn[0,1] mM (fg.cél ⁻¹)	6,7 ±0,05	
S[0] mM (ng.rotífero ⁻¹)	3,34a ±0,22	S[0,1] mM (ng.rotífero ⁻¹)	6,12b ±0,79	
S[0] mM (pg.cél ⁻¹)	0,54 ±0,045	S[0,1] mM (pg.cél ⁻¹)	0,55 ±0,035	
Fe[0] mM (ng.rotífero ⁻¹)	0,11a ±0,009	Fe[20,0] mM (ng.rotífero ⁻¹)	0,72b ±0,07	
Fe[0] mM (fg.cél ⁻¹)	7,0 ±0,82	Fe[20,0] mM (fg.cél ⁻¹)	22,0 ±1,02	
Cu[0] mM (pg.rotífero ⁻¹)	4,8a ±0,22	Cu[0,1] mM (pg.rotífero ⁻¹)	5,6b ±0,32	
Cu[0] mM (fg.cél ⁻¹)	0,12 ±0,02	Cu[0,1] mM (fg.cél ⁻¹)	0,18 ±0,02	

Tabla 5. Composición de Ácidos Grasos en *Brachionus plicatilis* (% del total A.G.), ácidos grasos x rotífero (A.G. ng.rotífero⁻¹) y lípidos totales x rotífero (ng.rotífero⁻¹) alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes concentraciones (mM) de elementos.

	(Control)				[Ca1,0]				[Se1,0]				[S1,0]				[Mg1,0]			
	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹
Acido Graso																				
12:0	0.26±0.03	0.08±0.00	1.04±0.13	0.50±0.05	0.49±0.03	0.23±0.02	0.28±0.03	0.18±0.04	0.22±0.02	0.13±0.01			0.28±0.03	0.18±0.04	0.22±0.02	0.13±0.01				
14:0	7.30±0.76	2.27±0.36	7.25±0.11	4.02±0.33	7.18±0.31	3.14±0.52	7.22±0.10	4.64±0.39	7.33±0.31	4.34±0.52			7.22±0.10	4.64±0.39	7.33±0.31	4.34±0.52				
15:0	0.67±0.05	0.21±0.03	0.61±0.07	0.34±0.01	0.56±0.04	0.24±0.01	0.52±0.04	0.33±0.04	0.52±0.04	0.33±0.05			0.52±0.04	0.33±0.04	0.52±0.04	0.33±0.05				
16:0	25.75±1.16	8.02±0.10	26.06±2.34	14.45±1.48	22.34±1.87	9.56±0.59	26.10±2.34	16.78±1.57	27.10±0.13	16.04±1.96			26.10±2.34	16.78±1.57	27.10±0.13	16.04±1.96				
16:1(n-7)	33.48±2.63	10.42±1.43	34.39±0.63	18.75±1.19	32.08±2.80	13.75±1.33	35.86±3.32	23.00±2.24	34.83±1.08	20.59±2.31			35.86±3.32	23.00±2.24	34.83±1.08	20.59±2.31				
16:2(n-6)	0.74±0.09	0.23±0.01	0.50±0.01	0.27±0.03	1.24±0.12	0.57±0.04	0.58±0.01	0.37±0.04	0.44±0.01	0.27±0.03			0.58±0.01	0.37±0.04	0.44±0.01	0.27±0.03				
16:2(n-4)	1.20±0.14	0.37±0.04	1.17±0.12	0.63±0.08	4.75±0.39	2.43±0.22	1.40±0.13	0.89±0.01	1.23±0.08	0.73±0.01			1.40±0.13	0.89±0.01	1.23±0.08	0.73±0.01				
16:3(n-3)	1.87±0.15	0.58±0.05	2.27±0.31	1.22±0.06	4.42±0.64	2.00±0.13	2.60±0.24	1.65±0.12	2.52±0.17	1.50±0.13			2.60±0.24	1.65±0.12	2.52±0.17	1.50±0.13				
18:0	3.36±0.26	1.04±0.09	3.45±0.33	1.96±0.10	3.40±0.13	1.27±0.07	2.66±0.14	1.69±0.10	2.49±0.07	1.48±0.19			2.66±0.14	1.69±0.10	2.49±0.07	1.48±0.19				
18:1(n-9)	3.12±0.38	0.96±0.06	2.65±0.28	1.43±0.14	2.24±0.15	0.82±0.04	2.11±0.18	1.34±0.04	2.06±0.10	1.22±0.18			2.11±0.18	1.34±0.04	2.06±0.10	1.22±0.18				
18:1(n-7)	5.28±0.63	1.64±0.19	4.79±0.37	2.57±0.24	5.58±0.59	2.14±0.16	6.21±0.49	3.95±0.41	5.35±0.23	3.18±0.25			6.21±0.49	3.95±0.41	5.35±0.23	3.18±0.25				
18:2(n-6)	2.05±0.24	0.63±0.04	0.93±0.02	0.49±0.06	1.39±0.08	0.51±0.02	1.01±0.12	0.54±0.01	0.91±0.02	0.54±0.05			1.01±0.12	0.54±0.01	0.91±0.02	0.54±0.05				
18:3(n-6)	0.28±0.03	0.09±0.01	0.13±0.01	0.07±0.00	0.37±0.01	0.14±0.01	0.17±0.01	0.11±0.01	0.16±0.01	0.10±0.02			0.17±0.01	0.11±0.01	0.16±0.01	0.10±0.02				
18:3(n-3)	0.64±0.01	0.20±0.02	0.45±0.01	0.23±0.04	0.53±0.03	0.20±0.02	0.40±0.05	0.26±0.02	0.42±0.03	0.25±0.03			0.40±0.05	0.26±0.02	0.42±0.03	0.25±0.03				
18:4(n-3)	0.20±0.03	0.06±0.00	0.23±0.02	0.12±0.01	0.33±0.02	0.12±0.01	0.25±0.02	0.16±0.01	0.24±0.01	0.14±0.02			0.25±0.02	0.16±0.01	0.24±0.01	0.14±0.02				
20:0	1.26±0.07	0.39±0.02	1.27±0.13	0.67±0.01	1.29±0.07	0.48±0.02	1.18±0.12	0.75±0.01	1.01±0.13	0.61±0.02			1.18±0.12	0.75±0.01	1.01±0.13	0.61±0.02				
20:2(n-9)	0.22±0.03	0.07±0.01	0.12±0.01	0.06±0.00	0.18±0.01	0.07±0.00	0.08±0.00	0.05±0.00	0.09±0.00	0.05±0.00			0.08±0.00	0.05±0.00	0.09±0.00	0.05±0.00				
20:3(n-5)	0.30±0.03	0.09±0.00	0.13±0.01	0.07±0.00	0.23±0.01	0.09±0.00	0.19±0.02	0.12±0.01	0.14±0.01	0.08±0.01			0.19±0.02	0.12±0.01	0.14±0.01	0.08±0.01				
20:4(n-6)	0.92±0.01	0.28±0.03	0.45±0.02	0.23±0.01	0.68±0.04	0.25±0.02	0.66±0.02	0.42±0.01	0.57±0.03	0.34±0.03			0.66±0.02	0.42±0.01	0.57±0.03	0.34±0.03				
20:4(n-3)	0.58±0.01	0.18±0.02	0.43±0.03	0.22±0.02	0.59±0.03	0.22±0.02	0.67±0.02	0.43±0.04	0.55±0.03	0.33±0.03			0.67±0.02	0.43±0.04	0.55±0.03	0.33±0.03				
20:5(n-3)	7.17±0.59	2.22±0.29	8.99±0.58	4.84±0.37	9.02±0.72	3.16±0.22	9.73±0.43	6.06±0.21	8.73±0.67	5.15±0.59			9.73±0.43	6.06±0.21	8.73±0.67	5.15±0.59				
22:0	0.23±0.05	0.07±0.00	0.22±0.02	0.12±0.01	0.56±0.05	0.20±0.01	0.18±0.02	0.11±0.01	0.16±0.02	0.09±0.00			0.18±0.02	0.11±0.01	0.16±0.02	0.09±0.00				
22:1	0.16±0.01	0.05±0.00	0.24±0.01	0.13±0.02	0.30±0.03	0.11±0.01	0.15±0.02	0.10±0.03	0.16±0.01	0.09±0.00			0.15±0.02	0.10±0.03	0.16±0.01	0.09±0.00				
22:3	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00			0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00				
22:5(n-3)	1.72±0.11	0.53±0.05	1.70±0.07	0.93±0.04	1.03±0.13	0.41±0.03	1.44±0.12	0.92±0.03	1.44±0.15	0.85±0.08			1.44±0.12	0.92±0.03	1.44±0.15	0.85±0.08				
22:6(n-3)	1.25±0.10	0.39±0.04	1.19±0.12	0.65±0.01	1.08±0.06	0.41±0.01	1.45±0.13	0.93±0.01	1.26±0.10	0.75±0.01			1.45±0.13	0.93±0.01	1.26±0.10	0.75±0.01				
Saturados	38.57±1.09	12.01±1.40	38.86±3.28	21.56±1.87	35.34±1.26	14.90±1.44	37.86±3.82	24.31±2.24	38.66±0.21	22.89±2.84			37.86±3.82	24.31±2.24	38.66±0.21	22.89±2.84				
Monounsaturados	42.04±1.8b	13.07±1.35	42.06±1.5b	22.87±2.40	40.19±1.6a	16.82±1.40	44.32±2.2d	28.39±2.80	42.41±0.8c	25.09±2.90			44.32±2.2d	28.39±2.80	42.41±0.8c	25.09±2.90				
Poliinsaturados	19.12±1.4d	5.92±0.47	18.04±1.5b	9.69±0.51	23.99±2.2e	10.18±1.06	17.54±1.0a	11.07±0.92	18.71±0.8c	11.08±1.41			17.54±1.0a	11.07±0.92	18.71±0.8c	11.08±1.41				
ω -3	11.70±1.43	3.62±0.44	12.91±1.09	6.94±0.89	14.13±0.98	5.70±0.41	15.21±1.69	9.47±0.82	13.73±0.66	8.12±0.79			15.21±1.69	9.47±0.82	13.73±0.66	8.12±0.79				
ω -6	5.24±0.37	1.62±0.12	3.19±0.27	1.70±0.13	4.75±0.42	1.89±0.14	3.88±0.28	2.47±0.24	3.34±0.23	1.99±0.13			3.88±0.28	2.47±0.24	3.34±0.23	1.99±0.13				
ω -3/ω -6	2.24±0.1a	2.24±0.06	4.11±0.4d	4.11±0.40	3.03±0.3b	3.03±0.33	3.92±0.3c	3.92±0.32	4.11±0.3d	4.11±0.26			3.92±0.3c	3.92±0.32	4.11±0.3d	4.11±0.26				
EPA	7.17±0.6a	2.22±0.29	8.99±0.6c	4.84±0.37	9.02±0.7c	3.16±0.22	9.73±0.4d	6.06±0.21	8.73±0.7b	5.15±0.59			9.73±0.4d	6.06±0.21	8.73±0.7b	5.15±0.59				
DHA	1.25±0.1c	0.39±0.04	1.19±0.1b	0.65±0.01	1.08±0.1a	0.41±0.04	1.45±0.1d	0.93±0.0	1.26±0.1c	0.75±0.01			1.45±0.1d	0.93±0.0	1.26±0.1c	0.75±0.01				
EPA/DHA	5.74±0.3a	5.74±0.27	7.55±0.8d	7.55±0.83	8.35±0.3e	8.35±0.35	6.71±0.6b	6.71±0.57	6.93±0.4c	6.93±0.37			6.71±0.6b	6.71±0.57	6.93±0.4c	6.93±0.37				
DHA/EPA	0.17±0.01	0.17±0.01	0.14±0.01	0.14±0.01	0.12±0.01	0.12±0.01	0.15±0.01	0.15±0.01	0.14±0.01	0.14±0.01			0.15±0.01	0.15±0.01	0.14±0.01	0.14±0.01				
EPA/ARA	7.79±0.6a	2.22±0.29	19.98±1.3e	13.26±1.0b	13.26±1.0b	14.74±0.9c	14.74±0.9c	15.31±1.2d	15.31±1.2d	15.31±1.2d			14.74±0.9c	15.31±1.2d	15.31±1.2d	15.31±1.2d				
Total A.G.	±	31.08±2.8a	±	54.62±1.0c	±	42.13±2.5b	±	63.95±3.2e	±	59.18±5.0d			±	63.95±3.2e	±	59.18±5.0d				
Total Lípidos	±	131.39±9.07	±	169.66±16.88	±	134.61±5.33	±	230.87±8.43	±	252.67±14.51			±	230.87±8.43	±	252.67±14.51				

A.G. ácido graso, EPA, eicosapentaénico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0.05$).

Tabla 6. Composición de Ácidos Grasos en *Brachionus plicatilis* (% del total A.G.), ácidos grasos x rotífero (A.G. ng.rotífero⁻¹) y lípidos totales x rotífero (ng.rotífero⁻¹) alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes concentraciones (mM) de elementos.

Ácido Graso	(Control)			[Zn0,1]			[S0,1]			[Fe20,0]			[Cu0,1]		
	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.
12:0	2.55±0.14	0.69±0.04	3.54±0.25	2.00±0.16	0.60±0.05	1.41±0.14	1.41±0.14	0.71±0.02	2.06±0.29	2.06±0.29	0.96±0.06	2.06±0.29	2.06±0.29	0.96±0.06	2.06±0.29
14:0	7.93±0.38	2.05±0.25	6.10±0.58	8.16±0.10	2.44±0.33	7.58±0.12	7.58±0.12	3.82±0.11	8.04±0.10	8.04±0.10	3.71±0.36	8.04±0.10	8.04±0.10	3.71±0.36	8.04±0.10
15:0	0.71±0.05	0.18±0.02	0.84±0.08	0.72±0.05	0.22±0.02	0.62±0.05	0.62±0.05	0.31±0.02	0.65±0.02	0.65±0.02	0.30±0.02	0.65±0.02	0.65±0.02	0.30±0.02	0.65±0.02
16:0	22.15±2.04	5.80±0.21	25.05±1.45	21.07±1.20	6.35±0.16	24.79±2.19	24.79±2.19	12.51±1.29	21.97±0.56	21.97±0.56	10.10±0.13	21.97±0.56	21.97±0.56	10.10±0.13	21.97±0.56
16:1(n-7)	31.89±3.65	8.27±0.35	30.69±0.86	31.42±1.08	9.42±0.17	33.97±1.03	33.97±1.03	17.13±0.81	32.78±0.14	32.78±0.14	15.07±0.65	32.78±0.14	32.78±0.14	15.07±0.65	32.78±0.14
16:2(n-6)	1.24±0.14	0.32±0.02	0.85±0.07	1.19±0.12	0.36±0.01	1.01±0.13	1.01±0.13	0.51±0.05	1.14±0.05	1.14±0.05	0.52±0.05	1.14±0.05	1.14±0.05	0.52±0.05	1.14±0.05
16:2(n-4)	1.96±0.15	0.51±0.02	1.25±0.09	1.73±0.19	0.52±0.01	1.97±0.18	1.97±0.18	0.99±0.06	1.60±0.14	1.60±0.14	0.73±0.02	1.60±0.14	1.60±0.14	0.73±0.02	1.60±0.14
16:3(n-3)	7.01±0.78	1.88±0.17	1.63±0.18	2.66±0.02	0.80±0.01	3.57±0.32	3.57±0.32	1.80±0.12	3.07±0.10	3.07±0.10	1.41±0.10	3.07±0.10	3.07±0.10	1.41±0.10	3.07±0.10
18:0	2.07±0.11	0.54±0.01	3.73±0.36	2.63±0.15	0.78±0.01	1.29±0.18	1.29±0.18	0.65±0.07	3.41±0.25	3.41±0.25	1.58±0.16	3.41±0.25	3.41±0.25	1.58±0.16	3.41±0.25
18:1(n-9)	0.67±0.04	0.16±0.02	2.28±0.28	1.05±0.13	0.32±0.01	0.36±0.04	0.36±0.04	0.18±0.03	1.48±0.13	1.48±0.13	0.69±0.04	1.48±0.13	1.48±0.13	0.69±0.04	1.48±0.13
18:1(n-7)	6.91±0.55	1.78±0.13	6.07±0.82	7.23±0.85	2.17±0.14	6.62±0.26	6.62±0.26	3.33±0.08	6.72±0.49	6.72±0.49	3.08±0.30	6.72±0.49	6.72±0.49	3.08±0.30	6.72±0.49
18:2(n-6)	1.46±0.12	0.37±0.02	1.81±0.17	1.80±0.14	0.55±0.02	1.05±0.15	1.05±0.15	0.53±0.06	1.18±0.06	1.18±0.06	0.53±0.03	1.18±0.06	1.18±0.06	0.53±0.03	1.18±0.06
18:3(n-6)	0.16±0.02	0.04±0.00	0.13±0.02	0.16±0.02	0.05±0.00	0.14±0.01	0.14±0.01	0.07±0.00	0.16±0.02	0.16±0.02	0.07±0.01	0.16±0.02	0.16±0.02	0.07±0.01	0.16±0.02
18:3(n-3)	0.63±0.02	0.16±0.02	0.72±0.02	0.90±0.02	0.27±0.03	2.18±0.28	2.18±0.28	1.11±0.04	0.72±0.02	0.72±0.02	0.33±0.02	0.72±0.02	0.72±0.02	0.33±0.02	0.72±0.02
18:4(n-3)	0.16±0.01	0.04±0.00	0.17±0.02	0.17±0.03	0.05±0.00	0.17±0.01	0.17±0.01	0.08±0.00	0.24±0.02	0.24±0.02	0.11±0.02	0.24±0.02	0.24±0.02	0.11±0.02	0.24±0.02
20:0	1.23±0.13	0.31±0.03	1.54±0.16	2.02±0.15	0.61±0.02	1.23±0.18	1.23±0.18	0.62±0.08	1.59±0.16	1.59±0.16	0.72±0.02	1.59±0.16	1.59±0.16	0.72±0.02	1.59±0.16
20:2(n-9)	0.07±0.00	0.02±0.00	0.09±0.01	0.09±0.02	0.03±0.01	0.06±0.00	0.06±0.00	0.03±0.00	0.21±0.01	0.21±0.01	0.10±0.00	0.21±0.01	0.21±0.01	0.10±0.00	0.21±0.01
20:3(n-5)	0.16±0.02	0.04±0.00	0.18±0.03	0.20±0.02	0.06±0.00	0.16±0.02	0.16±0.02	0.08±0.01	0.14±0.00	0.14±0.00	0.06±0.00	0.14±0.00	0.14±0.00	0.06±0.00	0.14±0.00
20:4(n-6)	0.49±0.02	0.12±0.02	0.65±0.08	0.58±0.01	0.18±0.02	0.44±0.05	0.44±0.05	0.22±0.02	0.55±0.03	0.55±0.03	0.25±0.01	0.55±0.03	0.55±0.03	0.25±0.01	0.55±0.03
20:4(n-3)	0.34±0.01	0.08±0.00	0.58±0.04	0.56±0.02	0.17±0.02	0.37±0.01	0.37±0.01	0.19±0.02	0.58±0.05	0.58±0.05	0.27±0.01	0.58±0.05	0.58±0.05	0.27±0.01	0.58±0.05
20:5(n-3)	6.14±0.42	1.86±0.13	8.09±0.61	10.52±0.09	2.96±0.25	8.66±0.43	8.66±0.43	4.36±0.10	9.27±0.05	9.27±0.05	3.98±0.32	9.27±0.05	9.27±0.05	3.98±0.32	9.27±0.05
22:0	0.06±0.00	0.02±0.00	0.15±0.01	0.06±0.01	0.02±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.02±0.00	0.15±0.02	0.15±0.02	0.07±0.01	0.15±0.02	0.15±0.02	0.07±0.01	0.15±0.02
22:1	0.15±0.01	0.04±0.00	0.23±0.03	0.23±0.03	0.06±0.01	0.16±0.02	0.16±0.02	0.08±0.01	0.21±0.02	0.21±0.02	0.10±0.00	0.21±0.02	0.21±0.02	0.10±0.00	0.21±0.02
22:3	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
22:5(n-3)	1.31±0.15	0.32±0.06	2.34±0.22	2.15±0.15	0.64±0.01	1.50±0.10	1.50±0.10	0.76±0.03	1.67±0.13	1.67±0.13	0.77±0.01	1.67±0.13	1.67±0.13	0.77±0.01	1.67±0.13
22:6(n-3)	1.14±0.13	0.29±0.01	1.28±0.15	1.36±0.13	0.40±0.05	1.10±0.10	1.10±0.10	0.56±0.06	1.02±0.12	1.02±0.12	0.47±0.04	1.02±0.12	1.02±0.12	0.47±0.04	1.02±0.12
Saturados	34.14±3.17	8.89±0.75	37.42±3.10	34.66±1.14	10.41±1.44	35.55±2.07	35.55±2.07	17.93±1.25	35.79±1.17	35.79±1.17	16.47±1.18	35.79±1.17	35.79±1.17	16.47±1.18	35.79±1.17
Monounsaturados	39.63±3.1a	10.24±1.48	39.27±1.4c	39.92±0.1a	11.99±1.56	41.10±1.2b	41.10±1.2b	20.72±0.84	41.19±0.2b	41.19±0.2b	18.94±0.73	41.19±0.2b	41.19±0.2b	18.94±0.73	41.19±0.2b
Poliinsaturados	23.68±2.5d	6.07±0.56	19.77±1.1a	23.41±2.8d	7.04±0.36	22.36±2.2c	22.36±2.2c	11.27±1.16	20.96±2.5b	20.96±2.5b	9.61±0.79	20.96±2.5b	20.96±2.5b	9.61±0.79	20.96±2.5b
ω -3	13.25±1.63	3.11±0.15	12.47±0.83	15.51±1.49	4.66±0.38	16.04±1.22	16.04±1.22	8.09±0.22	14.31±1.14	14.31±1.14	6.57±0.28	14.31±1.14	14.31±1.14	6.57±0.28	14.31±1.14
ω -6	4.49±0.50	1.16±0.12	4.72±0.34	5.08±0.48	1.53±0.14	3.73±0.39	3.73±0.39	1.88±0.14	4.04±0.28	4.04±0.28	1.85±0.13	4.04±0.28	4.04±0.28	1.85±0.13	4.04±0.28
ω -3/ω -6	2.95±0.2b	2.95±0.17	2.64±0.1a	3.07±0.2c	3.07±0.22	4.32±0.4e	4.32±0.4e	4.32±0.37	3.60±0.2d	3.60±0.2d	3.60±0.25	3.60±0.2d	3.60±0.2d	3.60±0.25	3.60±0.2d
EPA	6.14±0.4a	1.86±0.13	8.09±0.6b	10.52±0.9e	2.96±0.25	8.66±0.4c	8.66±0.4c	4.36±0.10	9.27±0.2d	9.27±0.2d	3.98±0.32	9.27±0.2d	9.27±0.2d	3.98±0.32	9.27±0.2d
DHA	1.14±0.1a	0.29±0.02	1.28±0.1b	1.36±0.1c	0.40±0.05	1.10±0.1a	1.10±0.1a	0.56±0.06	1.02±0.1a	1.02±0.1a	0.47±0.04	1.02±0.1a	1.02±0.1a	0.47±0.04	1.02±0.1a
EPA/DHA	5.38±0.3a	5.38±0.30	6.35±0.3b	7.73±0.3c	7.73±0.33	7.93±0.6c	7.93±0.6c	7.93±0.59	9.08±0.1d	9.08±0.1d	9.08±0.14	9.08±0.1d	9.08±0.1d	9.08±0.14	9.08±0.1d
DHA/EPA	0.18±0.01	0.18±0.01	0.13±0.01	0.13±0.02	0.13±0.02	0.13±0.02	0.13±0.02	0.13±0.02	0.11±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01
EPA/ARA	12.53±0.9a	12.45±1.2a	12.45±1.2a	18.14±1.6c	18.14±1.6c	19.68±1.4d	19.68±1.4d	16.85±1.2b	16.85±1.2b	16.85±1.2b	16.85±1.2b	16.85±1.2b	16.85±1.2b	16.85±1.2b	16.85±1.2b
Total A.G.	± 25.89±2.7a	± 25.46±1.5a	± 25.46±1.5a	± 30.03±2.0b	± 30.03±2.0b	± 50.64±1.7d	± 50.64±1.7d	± 50.64±1.7d	± 50.64±1.7d	± 50.64±1.7d	± 45.98±1.8c	± 50.64±1.7d	± 50.64±1.7d	± 45.98±1.8c	± 50.64±1.7d
Total Lípidos	± 73.37±5.57	± 73.37±5.57	± 73.37±5.57	± 111.37±6.29	± 111.37±6.29	± 74.24±2.75	± 74.24±2.75	± 74.24±2.75	± 74.24±2.75	± 74.24±2.75	± 74.37±3.17	± 74.24±2.75	± 74.24±2.75	± 74.37±3.17	± 74.24±2.75

A.G. ácido graso, EPA, eicosapentaénico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0,05).

Tabla 8

**Cultivo de *Artemia franciscana* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* (cultivo semicontinuo) y elementos óptimos (modificado de Fábregas et al., 1984).
Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹**

	Control	Silicio1,0mM	Selenio1,0mM	Calcio1,0mM	Magnesio1,0mM
Densidad celular (10⁶ cél.mL⁻¹ std)	46,75 ±3,64	55,13 ±4,82	56,38 ±4,29	51,75 ±5,12	53,63 ±2,89
Productividad (10⁹ céls.L⁻¹.día⁻¹)	14,02 ±1,24	16,54 ±1,64	16,91 ±1,43	15,25 ±1,37	16,09 ±1,53
F.O. celular					
%proteína en F.O.	46,73	36,63	46,39	39,69	39,10
% carboh. en F.O.	29,65	36,79	29,57	32,47	38,54
% lípidos en F.O.	23,61	26,58	24,04	27,84	22,36
F.O. Artemia					
%proteína en F.O.	65,39	58,39	62,13	57,85	60,97
% carboh. en F.O.	13,31	15,92	15,65	13,97	14,34
% lípidos en F.O.	21,30	25,68	22,21	28,17	24,69
Proteínas (pg.cél⁻¹ ±std)	6,2a 0,61	6,50b ±0,30	6,95c ±0,10	7,19d ±0,29	6,58b ±0,24
Carbohidratos (pg.cél⁻¹ ± std)	3,9a ±0,14	6,53e ±0,21	4,4b ±0,20	5,9c ±0,48	6,49de ±0,64
Lípidos (pg.cél⁻¹ ± std)	3,1a ±0,11	4,7d ±0,35	3,6b ±0,11	5,0e ±0,33	3,8c ±0,31
Peso orgánico pg.cel⁻¹	13,32	17,74	14,98	18,11	16,83
Proteínas (µg.artemia⁻¹ ±std)	85,79 ±4,47	125,83 ±11,97	103,26 ±10,70	141,21 ±11,79	101,09 ±2,25
Carbohidratos (µg.artemia⁻¹ ±std)	17,46 ±1,24	34,31 ±1,69	26,01 ±1,91	34,11 ±1,45	23,78 ±1,37
Lípidos (µg.artemia⁻¹ ±std)	27,94 ±1,17	55,34 ±4,98	36,91 ±1,96	68,76 ±3,34	40,93 ±1,49
Peso orgánico (µg.artemia⁻¹)	131,19	215,48	166,18	244,08	165,80
Valor calórico (10⁻⁷ J.célula⁻¹)	3,41	4,53	3,84	4,72	4,16
Valor calórico (10⁻⁶ J.artemia⁻¹)	3,5a	5,8c	4,4b	6,7d	4,45b
Peso seco (µg.mL⁻¹ ±std)	788,47 ±58,42	958,33 ±27,82	867,67 ±83,52	819,20 ±25,32	863,47 ±9,36
Peso seco (pg.cel⁻¹ ±std)	15,85 ±1,90	21,42 ±1,61	18,35 ±1,36	22,02 ±1,13	20,66 ±1,47
Peso seco (µg.artemia⁻¹ ±std)	139,2a ±5,01	228,83c ±13,80	176,50b ±15,55	261,41d ±15,60	176,36b ±12,06
Cenizas (pg.cel⁻¹ ±std)	2,53 ±0,056	3,68 ±0,25	3,37 ±0,35	3,91 ±0,15	3,84 ±0,28
Cenizas (µg.artemia⁻¹ ±std)	8,00a ±0,75	17,74d ±1,90	10,31b ±1,06	17,33c ±1,50	10,56b ±1,86
Materia Orgánica (pg.cel⁻¹ ±std)	13,32 ±1,49	18,92 ±1,10	14,98 ±1,32	18,10 ±1,21	16,83 ±1,46
Materia Orgánica (µg.artemia⁻¹ ±std)	131,19a ±12,25	215,19c ±13,41	166,18b ±15,55	244,08d ±15,10	165,80b ±13,78
Supervivencia (% ± std)	66,9a ±4,52	81,00d ±7,61	82,47e ±5,26	77,90b ±4,29	79,90c ±6,28
Longitud Total (mm.artemia⁻¹)	6,16a ±3,39	6,53c ±5,19	6,81e ±6,35	6,69d ±3,89	6,33b ±5,28
Q_N.célula (pg)	8,40 ±0,10	9,83 ±0,39	8,68 ±0,70	9,62 ±0,12	9,70 ±0,17
Q_C célula (pg)	63,77 ±8,36	77,39 ±1,36	65,31 ±1,15	73,27 ±1,88	74,43 ±1,53
RelaciónC:N(átomos)	6,51	6,75	6,45	6,53	6,58

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$)

Tabla 9

**Cultivo de *Artemia franciscana* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* (cultivo semicontinuo) y elementos óptimos (modificado de Fabregas *et al.*, 1984).
Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹**

	Control	Azufre0,1mM	Zinc0,1mM	Cobre0,1mM	Hierro20,0mM
Densidad celular (10⁶ cél.mL⁻¹ std)	41,88 ±3,64	53,88 ±4,26	51,12 ±5,08	43,63 ±3,59	39,80 ±4,01
Productividad (10⁹ céls.L⁻¹.día⁻¹)	12,56	16,16	15,34	13,09	11,94
F.O. celular					
% proteína en F.O.	67,81	39,04	41,76	41,11	33,44
% carboh. en F.O.	12,89	39,35	42,96	43,82	45,18
% lípidos en F.O.	19,29	21,61	15,29	15,07	21,37
F.O. Artemia					
% proteína en F.O.	67,94	54,25	70,70	66,10	65,77
% carboh. en F.O.	13,84	17,32	9,45	15,76	15,47
% lípidos en F.O.	19,21	28,41	19,84	18,13	18,74
Proteínas (pg.cél⁻¹ ± std)	6,05 ±0,50	6,27 ±0,60	7,72 ±0,11	7,13 ±0,50	7,93 ±0,40
Carbohidratos (pg.cél⁻¹ ± std)	3,95 ±0,17	6,32 ±0,11	7,95 ±0,75	7,60 ±0,19	10,72 ±0,87
Lípidos (pg.cél⁻¹ ± std)	2,19 ±0,20	3,47 ±0,38	2,83 ±0,061	2,61 ±0,19	5,07 ±0,28
P. orgánico pg.cél⁻¹	12,17	16,07	18,49	17,35	23,72
Proteínas (µg.artemia⁻¹ ± std)	110,25a ±12,47	124,89bc ±9,97	232,02c ±14,75	109,70a ±12,0	113,02ab ±1,68
Carbohidratos (µg.artemia⁻¹ ± std)	20,96a ±2,07	40,85c ±0,55	31,02bc ±3,05	26,17ab ±3,00	26,60ab ±1,38
Lípidos (µg.artemia⁻¹ ± std)	31,37a ±2,47	66,98c ±1,77	65,11bc ±4,68	30,08a ±2,75	32,21ab ±4,86
Peso orgánico (µg.artemia⁻¹)	163,58	232,72	328,15	165,95	171,83
Valor calórico (10⁻⁷ J.célula⁻¹)	2,98	3,95	4,31	4,03	5,72
Valor calórico (10⁻⁶ J.artemia⁻¹)	4,26a	6,41c	8,67d	4,26a	4,43b
Peso seco µg.mL⁻¹ ±std	972,10 ±35,60	1051,71 ±27,22	1028,03 ±45,16	876,63 ±10,03	893,53 ±26,55
Peso seco (pg.cél⁻¹ ±std)	14,36 ±1,51	19,24 ±1,85	21,83 ±1,67	20,70 ±1,88	27,77 ±1,23
Peso seco (µg.artemia⁻¹ ±std)	173,72a ±13,18	247,38d ±17,06	348,16e ±19,92	177,04b ±10,52	182,31c ±10,56
Cenizas (pg.cél⁻¹ ±std)	2,19 ±0,21	3,17 ±0,29	3,34 ±0,19	3,36 ±0,25	4,05 ±0,37
Cenizas (µg.artemia⁻¹ ±std)	10,14a ±1,21	14,66c ±1,02	20,01d ±1,16	11,09b ±1,14	10,48a ±15,10
Materia Orgánica (pg.cél⁻¹ ±std)	12,17 ±1,01	16,07 ±1,67	18,49 ±1,41	17,35 ±1,05	23,72 ±1,39
Materia Orgánica (µg.artemia⁻¹ ±std)	163,58a ±12,68	232,72c ±19,10	328,15d ±23,79	165,95a ±13,08	182,31b ±13,02
Supervivencia (% ± std)	73,57a ±5,85	89,90c ±7,26	87,90b ±7,46	91,00d ±6,36	92,46e ±8,62
Longitud Total (mm.artemia⁻¹)	6,04a ±0,51	6,90b ±,74	7,90c ±0,59	9,33d ±0,46	7,94c ±0,73
Q_N celular (pg)	10,24 ±0,20	13,00 ±0,44	11,14 ±0,07	12,45 ±0,59	13,81 ±0,71
Q_C celular (pg)	75,96 ±2,709	93,48 ±2,27	73,27 ±0,73	80,25 ±2,09	94,15 ±0,49
RelaciónC:N(átomos)	6,16	6,36	5,64	5,52	5,84

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$)

<div> <div>Tabla 10</div> <div>Absorción atómica de elementos en <i>Artemia franciscana</i> alimentada con <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (cultivo semicontinuo) y elementos en concentraciones óptimas (modificado de Fábregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹</div> </div>			
Artemia sin		Artemia con	
Absorción Atómica	Adición elemento	Absorción Atómica	Adición elemento
Mg [0] mM (µg.artemia ⁻¹)	0,18a ±0,02	Mg[1,0] mM (µg.artemia ⁻¹)	0,93b ±0,03
Mg [0] mM (pg.cél ⁻¹)	0,33 ±0,01	Mg[1,0] mM (pg.cél ⁻¹)	0,45 ±0,01
Se [0] mM (µg.artemia ⁻¹)	0,012a ±0,001	Se[1,0] mM (µg.artemia ⁻¹)	0,13b ±0,01
Se[0] mM (fg.cél ⁻¹)	1,5 ±0,12	Se[1,0] mM (fg.cél ⁻¹)	4,9 ±0,10
Si[0] mM (µg.artemia ⁻¹)	0,041a ±0,002	Si[1,0] mM (µg.artemia ⁻¹)	0,78b ±0,03
Si[0] mM (fg.cél ⁻¹)	3,9 ±0,20	Si[1,0] mM (fg.cél ⁻¹)	5,1 ±0,29
Ca[0] mM (µg.artemia ⁻¹)	0,31a 0,01	Ca[1,0] mM (µg.artemia ⁻¹)	0,90b ±0,04
Ca[0] mM (pg.cél ⁻¹)	0,76 ±0,05	Ca[1,0] mM (pg.cél ⁻¹)	2,39 ±0,29
Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0,05).			

<div> <div>Tabla 1.1</div> <div>Absorción atómica de elementos en <i>Artemia franciscana</i> alimentada con <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (cultivo semicontinuo) y elementos en concentraciones óptimas (modificado de Fábregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%/día⁻¹</div> </div>			
Absorción Atómica	Artemia sin Adición elemento	Absorción Atómica	Artemia con Adición elemento
Zn[0] mM (µg.artemia ⁻¹)	0,043a ±0,002	Zn[0,1] mM (µg.artemia ⁻¹)	0,30b ±0,12
Zn[0] mM (fg.cél ⁻¹)	6,1 ±0,4	Zn[0,1] mM (fg.cél ⁻¹)	6,7 ±0,5
S[0] mM (µg.artemia ⁻¹)	0,73a ±0,32	S[0,1] mM (µg.artemia ⁻¹)	1,92b ±0,79
S[0] mM (pg.cél ⁻¹)	0,54 ±0,045	S[0,1] mM (pg.cél ⁻¹)	0,55 ±0,035
Fe[0] mM (µg.artemia ⁻¹)	0,18a ±0,01	Fe[20,0] mM (µg.artemia ⁻¹)	0,72b ±0,25
Fe[0] mM (fg.cél ⁻¹)	7,0 ±0,82	Fe[20,0] mM (fg.cél ⁻¹)	22,0 ±1,02
Cu[0] mM (µg.artemia ⁻¹)	0,78a ±0,02	Cu[0,1] mM (µg.artemia ⁻¹)	0,95b ±0,03
Cu[0] mM (fg.cél ⁻¹)	0,12 ±0,02	Cu[0,1] mM (fg.cél ⁻¹)	0,18 ±0,02
Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0,05).			

Tabla 12. Composición de Ácidos Grasos en *Artemia franciscana* (% del total A.G.), ácidos grasos x *Artemia* (A.G. µg.artemia⁻¹) y lípidos totales x *artemia* (µg.artemia⁻¹) alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes concentraciones (mM) de elementos.

Acido Graso	Control			[Mg1,0]			[Se1,0]			[Si1,0]			[Ca1,0]		
	%A.G.	µg.artemia ⁻¹	%A.G.	%A.G.	µg.artemia ⁻¹	%A.G.	%A.G.	µg.artemia ⁻¹	%A.G.	%A.G.	µg.artemia ⁻¹	%A.G.	%A.G.	µg.artemia ⁻¹	µg.artemia ⁻¹
14:0	6.21±0.58	1.01±0.12	5.89±0.65	5.19±0.36	2.62±0.17	1.17±0.12	6.61±0.67	2.09±0.19	5.85±0.21	2.30±0.10	2.30±0.10	2.30±0.10	2.30±0.10	2.30±0.10	2.30±0.10
15:0	0.50±0.07	0.08±0.00	0.43±0.02	0.30±0.03	0.19±0.01	0.06±0.00	0.50±0.01	0.15±0.01	0.42±0.04	0.16±0.01	0.16±0.01	0.16±0.01	0.16±0.01	0.16±0.01	0.16±0.01
16:0	28.07±2.84	4.19±0.38	36.33±2.68	29.39±0.85	12.43±1.38	6.57±0.86	15.04±1.30	3.13±0.29	21.73±1.21	9.07±0.32	9.07±0.32	9.07±0.32	9.07±0.32	9.07±0.32	9.07±0.32
16:1(n-7)	25.64±2.10	4.07±0.39	30.78±1.89	37.12±3.40	13.25±1.88	8.35±0.77	39.57±1.99	13.37±1.27	37.72±1.73	14.54±1.79	14.54±1.79	14.54±1.79	14.54±1.79	14.54±1.79	14.54±1.79
16:2(n-6)	1.74±0.18	0.28±0.03	0.37±0.01	0.41±0.01	0.16±0.01	0.09±0.00	0.43±0.02	0.12±0.01	0.75±0.05	0.26±0.01	0.26±0.01	0.26±0.01	0.26±0.01	0.26±0.01	0.26±0.01
16:2(n-4)	1.52±0.13	0.24±0.02	0.88±0.03	0.87±0.02	0.39±0.00	0.19±0.02	0.83±0.02	0.25±0.02	1.98±0.17	0.71±0.02	0.71±0.02	0.71±0.02	0.71±0.02	0.71±0.02	0.71±0.02
16:3(n-3)	1.26±0.14	0.20±0.01	0.63±0.03	0.81±0.01	0.27±0.03	0.18±0.02	0.76±0.02	0.25±0.01	1.48±0.18	0.52±0.02	0.52±0.02	0.52±0.02	0.52±0.02	0.52±0.02	0.52±0.02
18:0	9.95±0.30	1.62±0.18	4.76±0.50	3.77±0.34	1.87±0.17	0.84±0.03	18.35±1.99	8.03±0.82	4.99±0.47	1.69±0.18	1.69±0.18	1.69±0.18	1.69±0.18	1.69±0.18	1.69±0.18
18:1(n-9)	13.53±1.00	2.19±0.16	9.62±0.18	10.37±1.37	4.31±0.46	2.29±0.04	8.92±0.19	2.72±0.30	10.19±1.03	3.67±0.28	3.67±0.28	3.67±0.28	3.67±0.28	3.67±0.28	3.67±0.28
18:1(n-7)	5.35±0.34	0.86±0.08	3.31±0.28	5.30±0.36	1.51±0.15	1.18±0.07	3.58±0.41	1.02±0.12	4.75±0.36	1.74±0.13	1.74±0.13	1.74±0.13	1.74±0.13	1.74±0.13	1.74±0.13
18:2(n-6)	1.29±0.17	0.21±0.02	0.54±0.01	0.72±0.01	0.25±0.02	0.16±0.01	0.43±0.02	0.12±0.01	1.04±0.09	0.34±0.02	0.34±0.02	0.34±0.02	0.34±0.02	0.34±0.02	0.34±0.02
18:3(n-6)	0.15±0.01	0.02±0.00	0.06±0.00	0.09±0.00	0.03±0.00	0.02±0.00	0.06±0.00	0.02±0.00	0.22±0.02	0.07±0.00	0.07±0.00	0.07±0.00	0.07±0.00	0.07±0.00	0.07±0.00
18:4(n-3)	0.18±0.01	0.03±0.00	0.06±0.00	0.09±0.00	0.03±0.00	0.02±0.00	0.08±0.00	0.02±0.00	0.33±0.03	0.11±0.02	0.11±0.02	0.11±0.02	0.11±0.02	0.11±0.02	0.11±0.02
20:0	0.07±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00	0.03±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00	0.06±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
20:2(n-9)	0.09±0.00	0.01±0.00	0.03±0.00	0.06±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.03±0.00	0.01±0.00	0.06±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
20:3(n-5)	0.07±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00	0.06±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.04±0.00	0.01±0.00	0.09±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00
20:4(n-6)	0.33±0.01	0.05±0.00	0.13±0.00	0.22±0.02	0.06±0.00	0.05±0.00	0.15±0.01	0.04±0.00	0.32±0.00	0.11±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01
20:4(n-3)	0.05±0.00	0.01±0.00	0.02±0.01	0.03±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00	0.06±0.02	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01
20:5(n-3)	3.63±0.29	0.91±0.02	5.71±0.23	5.54±0.42	1.48±0.05	1.15±0.13	4.96±0.24	1.56±0.09	7.45±0.80	2.60±0.17	2.60±0.17	2.60±0.17	2.60±0.17	2.60±0.17	2.60±0.17
22:0	0.14±0.02	0.02±0.00	0.11±0.01	0.11±0.05	0.05±0.00	0.02±0.00	0.08±0.00	0.02±0.00	0.16±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01
22:3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
22:6(n-3)	0.23±0.03	0.04±0.00	0.15±0.01	0.20±0.01	0.07±0.00	0.04±0.00	0.17±0.01	0.04±0.00	0.34±0.01	0.12±0.02	0.12±0.02	0.12±0.02	0.12±0.02	0.12±0.02	0.12±0.02
Saturados	44.93±3.44	6.93±0.53	47.58±3.53	38.80±0.68	24.17±1.63	8.67±0.12	40.60±3.46	13.43±1.20	33.21±1.38	13.30±1.09	13.30±1.09	13.30±1.09	13.30±1.09	13.30±1.09	13.30±1.09
Monoinsaturados	44.53±4.2b	7.12±0.82	43.71±2.6c	52.79±2.0c	12.07±1.49	11.82±1.18	52.07±4.8d	17.11±1.03	52.66±1.9a	19.95±1.07	19.95±1.07	19.95±1.07	19.95±1.07	19.95±1.07	19.95±1.07
Poliinsaturados	10.54±1.2c	2.02±0.18	8.71±0.3b	8.42±0.8b	2.44±0.25	1.85±0.12	7.02±0.8a	2.087±0.16	14.13±1.3d	4.91±0.27	4.91±0.27	4.91±0.27	4.91±0.27	4.91±0.27	4.91±0.27
ω -3	7.43±0.71	1.19±0.12	4.59±0.31	6.72±0.64	1.87±0.09	1.40±0.18	5.65±0.60	1.88±0.11	9.66±0.10	3.37±0.29	3.37±0.29	3.37±0.29	3.37±0.29	3.37±0.29	3.37±0.29
ω -6	1.91±0.00	0.31±0.03	1.10±0.12	1.44±0.13	0.49±0.01	0.32±0.04	1.07±0.15	0.29±0.03	2.33±0.19	0.78±0.04	0.78±0.04	0.78±0.04	0.78±0.04	0.78±0.04	0.78±0.04
ω -3/ω -6	3.89±0.2a	3.89±0.17	4.17±0.4b	4.66±0.1c	4.17±0.40	4.66±0.05	5.28±0.2e	5.28±0.21	4.88±0.4d	4.88±0.44	4.88±0.44	4.88±0.44	4.88±0.44	4.88±0.44	4.88±0.44
EPA	3.63±0.3a	0.91±0.02	5.71±0.2c	5.54±0.4c	1.48±0.05	1.15±0.13	4.96±0.2b	1.56±0.09	7.45±0.8d	2.60±0.17	2.60±0.17	2.60±0.17	2.60±0.17	2.60±0.17	2.60±0.17
EPA/ARA	11.00±1.2a	-----	43.92±2.3e	25.18±1.9c	-----	-----	33.07±2.9d	-----	23.28±1.3b	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Total A.G.	±	16.07±1.3a	±	38.68±3.2d	±	22.34±2.7b	±	32.73±1.7c	±	38.15±1.5d	38.15±1.5d	38.15±1.5d	38.15±1.5d	38.15±1.5d	38.15±1.5d
Total Lípidos	±	27.94±1.17	±	40.93±3.56	±	36.91±1.96	±	55.13±4.98	±	68.76±3.34	68.76±3.34	68.76±3.34	68.76±3.34	68.76±3.34	68.76±3.34

A.G. ácido graso, EPA, eicosapentaénico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0.05$).

Tabla 13. Composición de Ácidos Grasos en *Artemia franciscana* (% del total A.G.), ácidos grasos x *Artemia* (A.G., $\mu\text{g} \cdot \text{artemia}^{-1}$) y lípidos totales x *artemia* ($\mu\text{g} \cdot \text{artemia}^{-1}$) alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes concentraciones (mM) de elementos.

Ácido Graso	Control			[Zn0,1]			[S0,1]			[Cu0,1]			[Fe20,0]		
	%A.G.	$\mu\text{g} \cdot \text{artemia}^{-1}$	%A.G.	%A.G.	$\mu\text{g} \cdot \text{artemia}^{-1}$	%A.G.	%A.G.	$\mu\text{g} \cdot \text{artemia}^{-1}$	%A.G.	%A.G.	$\mu\text{g} \cdot \text{artemia}^{-1}$	%A.G.	%A.G.	$\mu\text{g} \cdot \text{artemia}^{-1}$	$\mu\text{g} \cdot \text{artemia}^{-1}$
14:0	10.21±0.00	1.95±0.00	8.12±0.01	8.64±0.40	3.63±0.10	3.37±0.39	7.40±0.34	2.62±0.21	8.16±0.22	2.30±0.16					
15:0	0.54±0.00	0.10±0.01	0.47±0.02	0.42±0.07	0.21±0.01	0.16±0.01	0.29±0.02	0.10±0.01	0.52±0.01	0.14±0.01					
16:0	8.56±0.00	1.63±0.14	7.80±0.61	29.76±2.92	3.48±0.36	13.37±1.74	6.99±0.57	2.48±0.28	13.65±1.06	3.18±0.24					
16:1(n-7)	42.35±0.00	7.25±0.32	48.29±1.38	27.73±2.75	23.32±0.29	10.30±1.08	58.26±2.30	15.65±1.67	46.43±2.80	14.23±1.27					
16:2(n-6)	0.71±0.00	0.14±0.01	0.34±0.01	0.45±0.05	0.15±0.00	0.17±0.01	0.30±0.00	0.11±0.01	0.71±0.06	0.17±0.02					
16:3(n-4)	1.39±0.00	0.27±0.03	0.92±0.04	1.00±0.10	0.41±0.01	0.39±0.01	0.83±0.00	0.29±0.02	1.47±0.17	0.38±0.02					
16:3(n-3)	1.57±0.00	0.30±0.03	1.15±0.07	1.14±0.13	0.51±0.02	0.46±0.02	1.12±0.13	0.40±0.03	1.51±0.18	0.38±0.03					
18:0	7.16±0.00	1.37±0.09	8.22±0.19	8.34±0.91	3.67±0.10	3.33±0.14	3.98±0.36	1.41±0.13	3.45±0.28	1.01±0.14					
18:1(n-9)	14.69±0.00	2.81±0.25	10.30±0.50	10.39±0.64	4.60±0.34	4.03±0.50	8.62±0.48	1.06±0.28	10.91±1.15	2.86±0.32					
18:1(n-7)	6.19±0.00	1.18±0.12	3.64±0.06	3.93±0.36	1.62±0.16	1.53±0.14	3.86±0.26	1.37±0.12	4.36±0.54	1.20±0.18					
18:2(n-6)	1.28±0.00	0.24±0.02	0.52±0.01	0.60±0.06	0.23±0.02	0.23±0.02	0.71±0.04	0.25±0.01	1.14±0.09	0.28±0.01					
18:3(n-6)	0.20±0.00	0.04±0.00	0.095±0.01	0.09±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.14±0.01	0.05±0.00	0.16±0.01	0.04±0.00					
18:4(n-3)	0.08±0.00	0.02±0.00	0.07±0.00	0.05±0.00	0.03±0.01	0.02±0.00	0.12±0.01	0.04±0.00	0.13±0.01	0.03±0.00					
20:0	0.03±0.00	0.01±0.00	0.013±0.00	0.015±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00	0.21±0.03	0.04±0.00					
20:2(n-9)	0.08±0.00	0.015±0.00	0.02±0.00	0.04±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00	0.10±0.01	0.02±0.00					
20:3(n-5)	0.12±0.00	0.02±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.04±0.00	0.01±0.00	0.09±0.00	0.02±0.00					
20:4(n-6)	0.76±0.00	0.145±0.00	0.32±0.01	0.29±0.03	0.14±0.01	0.11±0.01	0.64±0.04	0.23±0.02	0.45±0.03	0.11±0.01					
20:4(n-3)	0.05±0.00	0.009±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00	0.03±0.00	0.01±0.00	0.04±0.00	0.01±0.00					
20:5(n-3)	4.35±0.00	1.58±0.12	9.56±0.61	8.29±0.33	4.29±0.33	1.57±0.18	6.54±0.05	2.32±0.19	6.34±0.21	1.68±0.12					
22:0	0.07±0.00	0.013±0.00	0.03±0.01	0.03±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.04±0.00	0.01±0.00	0.05±0.00	0.01±0.00					
22:3															
22:6(n-3)	0.09±0.00	0.02±0.00	0.04±0.00	0.05±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.05±0.00	0.02±0.00	0.13±0.01	0.03±0.00					
Saturados	26.56±0.00	5.08±0.05	24.66±0.42	51.15±2.38	11.01±0.46	20.25±1.40	18.72±1.03	6.63±0.43	26.05±1.68	6.69±0.50					
Monoinsaturados	63.23±0.0b	11.24±0.19	66.23±0.9c	38.12±2.7b	29.54±0.34	15.87±1.61	70.74±3.4b	25.07±1.38	61.70±1.7a	18.28±1.14					
Poliinsaturados	10.15±0.9b	2.69±0.17	9.11±0.5a	10.72±0.6b	4.070±0.33	2.59±0.12	10.54±0.9b	3.73±0.21	12.25±1.1c	3.16±0.36					
ω-3	5.62±0.91	1.83±0.17	10.86±0.56	9.52±0.73	4.86±0.32	2.02±0.11	7.86±0.68	2.78±0.28	8.15±0.24	2.14±0.22					
ω-6	2.95±0.00	0.56±0.04	1.28±0.00	1.43±0.14	0.57±0.01	0.56±0.02	1.79±0.18	0.63±0.04	2.45±0.19	0.59±0.03					
ω-3/ω-6	1.89±0.3a	1.89±0.31	8.49±0.4e	6.66±0.3d	8.49±0.46	6.66±0.32	4.39±0.3c	4.39±0.34	3.98±0.3b	3.98±0.31					
EPA	4.35±0.0a	1.58±0.12	9.56±0.6d	8.29±0.3c	4.29±0.33	1.57±0.18	6.54±0.0b	2.32±0.27	6.34±0.2b	1.68±0.12					
EPA/ARA	5.72±0.3a		29.87±2.3e	28.59±2.6d			10.22±1.2b		14.09±1.3c						
Total A.G.	±	19.11±0.9a	±	44.62±1.1e	±	38.70±3.8d	±	29.44±2.3c	±	28.13±2.1b					
Total Lípidos	±	31.37±2.19	±	65.11±4.56	±	66.98±5.61	±	30.08±0.13	±	32.21±2.26					

A.G. ácido graso, EPA, eicosapentaénico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0.05$).

Capítulo 4

Evaluación poblacional, modificación bioquímica e incorporación de elementos unitarios por ***Artemia franciscana*** y ***Brachionus plicatilis***, ocasionada por el enriquecimiento en cultivo con ***Isochrysis galbana* var. T-iso**, cultivada en sistema semicontinuo, con una tasa de renovación del 30% y concentración óptima de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} .

Introducción

La bioencapsulación o enriquecimiento es ahora, una práctica muy común en la cría en condiciones de laboratorio de estadios larvales tempranos y postlarvales de crustáceos y peces, con la finalidad de mejorar el valor nutricional del alimento vivo o para funcionar como vehículo de ingredientes específicos para el cultivo larvario. Un tópico muy de actualidad lo representa la nutrición mineral, la cual no se ha estudiado muy a fondo a pesar de saber que una gran cantidad de elementos están ligados a diversos procesos morfológicos, fisiológicos, pigmentación, supervivencia entre otros; principalmente en etapas tempranas de desarrollo larval de organismos acuáticos. Existe incertidumbre acerca de como es que ciertos elementos intervienen en la productividad poblacional y bioquímica de la cadena trófica. El valor nutricional de rotíferos y *Artemia* es fácilmente manipulable gracias a sus primitivas características de alimentación. Aprovechando que ambos organismos son filtradores no selectivos es que se han desarrollado métodos sencillos para incorporar en cortos o largos periodos de tiempo diversos tipos de productos en el alimento vivo funcionando como verdaderas capsulas vivas, antes de alimentar a las larvas de depredadores. Rotíferos y *Artemia* no son en la mayoría de los casos, el alimento natural de larvas de peces y crustáceos marinos. En cultivo, las larvas son alimentadas con dos o tres organismos durante los primeros 10-35 días de alimentación exógena. Esta incluye rotíferos de las especies *Brachionus rotundiformis*, *Brachionus plicatilis* y *Artemia* en estadios naupliar, metanaupliar pre-adultos y adultos. Un gran número de rotíferos y *Artemia*, alcanzando fácilmente varios miles de millones pueden ser necesarios por día para alimentar estadios larvales tempranos y postlarvales de organismos marinos en los criaderos comerciales (Lubzens *et al.*, 1997; 2001). La cantidad necesaria varía de 20,000 a 100,000 rotíferos entre el día 0 y 20 de alimentación exógena para larvas de peces marinos y de entre 100,000 a 225,000 *Artemias* (nauplios, metanauplios) entre el día 20 y 35 de cultivo (Kafuko and Ikenoue 1983; Lubzens *et al.*, 2001; Ronsón-Paulín comment. Pers.).

Diseño experimental

Se empleo un cultivo masivo del rotífero marino *Brachionus plicatilis* en Carboy's de 6 L, los cuales se filtraron y lavaron en periodos cortos con agua destilada para eliminar microbiota y posteriormente pasarlos a un nuevo carboy con agua de mar estéril. Tal proceso preventivo se realizó 24 h antes de iniciar los experimentos con la finalidad de estabulación alimentaria y sanidad de los rotíferos. Para realizar las experiencias de crecimiento poblacional, modificación bioquímica e incorporación de elementos. Los rotíferos a razón de 50 rotíferos.mL⁻¹ se transfirieron a botellas de borosilicato de 1 L con 700 mL de agua de mar autoclavada, sometidos a un flujo de aire de 20 burbujas.minuto⁻¹ aproximadamente, ciclos de luz:oscuridad 12h:12h, se utilizo una intensidad luminosa de 52,3 $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y mantenidos en una cámara isotérmica con 22±2°C. A primera hora del ciclo de luz se alimentó al rotífero *Brachionus plicatilis*, a razón de 30,000 células.rotífero⁻¹ con biomasa de *Isochrysis galbana* var. T-iso (en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%)

previamente cultivada con las concentraciones óptimas (para la mayor generación de biomasa, capítulo 2) de los elementos, por separado en el medio de cultivo "ALGAL" (Fábregas *et al.*, 1984) en las siguientes concentraciones: Fe^{3+} [20,0], S^{2-} [0,1], Zn^{2+} [1,0], Cu^{2+} [1,0], Mg^{2+} [10,0], Ca^{2+} [10,0], Si^{4+} [1,0] y Se^{2-} [1,0].

Diariamente a primera hora del ciclo de luz se realizó el recuento de la densidad de rotíferos. mL^{-1} así como del número de huevos por hembra, para posteriormente calcular la cantidad de biomasa celular para alimentar a razón de 30,000 células de *Isochrysis galbana* var. T-iso.rotífero $^{-1}$.

Los cultivos experimentales se mantuvieron durante 9 días tomando en cuenta que el ciclo de vida de *Brachionus plicatilis* dura aproximadamente 4 días (Ito 1955; 1957) por lo que los experimentos se finalizaron una vez transcurridas 2 generaciones. Al finalizar el periodo se contabilizó la densidad poblacional y número de huevos producidos, se cosecharon por triplicado 70 mL de cultivo para determinación de peso seco, cenizas y materia orgánica, así como 50 mL ($n=3$) de biomasa, en filtros de malla nitex de 40 μm para determinación de proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, e incorporación de metales; estas muestras se ultracongelaron a -80°C para su posterior análisis.

Se incubaron y eclosionaron en agua salobre al 2,5%, filtrada (1 μm), quistes de *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) del Gran Lago Salado Utha (INVE, Aquaculture, Inc.), en un baño termostático a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, una intensidad luminosa de 152,3 $\mu\text{mol quanta}/\text{m}^2/\text{s}^1$; por 24h y un flujo de aireación continua de 250 mL/min^1 (figura 4a). Una vez eclosionados los nauplios se lavaron con agua destilada y formalina al 4% por 10 segundos, como tratamiento bacteriano preventivo; posteriormente se mantuvieron en agua marina estéril al 3,5%. Se espera a que los metanauplios cumplieran 48h después de la eclosión (DDE), tiempo en el cual han desarrollado un sistema digestivo eficaz-completo y pueden empezar a filtrar no selectivamente alimento (Sorgeloos *et al.*, 2001). Para realizar las experiencias de crecimiento, supervivencia, modificación bioquímica e incorporación de elementos, los metanauplios $_{48\text{h}}$ se transfirieron a razón de 2 metanauplios. mL^{-1} en un volumen de 500mL en botellas de 1 L, sometidos a un flujo de aire de 20 burbujas.minuto $^{-1}$ aproximadamente, ciclos de luz:oscuridad 12h:12h, se utilizó una intensidad luminosa de 52,3 $\mu\text{mol quanta}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, las botellas de cultivo se mantuvieron en un baño termostático a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ dentro de una cámara isotérmica a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$.

A primera hora del ciclo de luz se alimentó a *Artemia franciscana*, a razón de 300,000 células.artemia $^{-1}$ (Gelabert, 2003) con biomasa de *Isochrysis galbana* var. T-iso (en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%) previamente cultivada con las concentraciones óptimas (para la mayor generación de biomasa, capítulo 1) de los elementos por separado en el medio de cultivo "ALGAL" (Fábregas *et al.*, 1984) en las siguientes concentraciones: Fe^{3+} [20,0], S^{2-} [0,1], Zn^{2+} [1,0], Cu^{2+} [1,0], Mg^{2+} [10,0], Ca^{2+} [10,0], Si^{4+} [1,0] y Se^{2-} [1,0].

Diariamente se contabilizó la densidad de células. mL^{-1} del cultivo de *Artemia* para de esa forma corregir la ración diaria de microalgas de modo que entre el día 1 y 9 se utilizó una densidad celular de entre 300,000 y 4,285,714 células. artemia^{-1}

Los cultivos experimentales se mantuvieron por 9 días, tiempo en el cual comenzó el cortejo de apareamiento, para cosechar la población al día 9. Se contabilizó la densidad poblacional, se cosecharon por triplicado 40 organismos para determinación de peso seco, cenizas y materia orgánica, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, e incorporación de metales; estas muestras se ultracongelaron a -80°C para su posterior análisis.

Resultados y discusión.

Se observó que en los tres primeros días de alimentación del rotífero *Brachionus plicatilis* con *Isochrysis galbana* var. T-iso no mostró crecimiento poblacional e incluso disminución de la población inicial (figura 1 a-b), situación similar ocurrió cuando se alimento con *Phaeodactylum tricornutum* (capítulo 3 aunque solo fue por dos días), situación que además se corrobora por la presencia de biomasa celular no filtrada por los rotíferos en cultivo. Este comportamiento pudo ser debido como lo menciona Ferreira, 2006 en sus estudios sobre bioencapsulación y crecimiento poblacional de la misma especie de rotífero, por manipulación, causante de estrés, por lo que este tiempo debe considerarse de alguna forma como un periodo de adaptación o fase "lag", donde es posible la eclosión de los huevos producidos por las hembras adultas así como muerte por adaptación de las mismas. Ulterior a este proceso a partir del 4to día (figura 1 a-b) la densidad poblacional de rotíferos comenzó a multiplicarse. Al respecto Snell, 1986; Lubzens and Minkoff, 1988; Hagiwara and Hino, 1990, mencionan que motivo de estrés fisicoquímico las hembras producen huevos dormantes por lo general entre 1 y 8 los cuales tardarán en eclosionar según las condiciones del medio de cultivo; siendo significativamente más pequeños que los 18-23 huevos producidos asexualmente posteriormente.

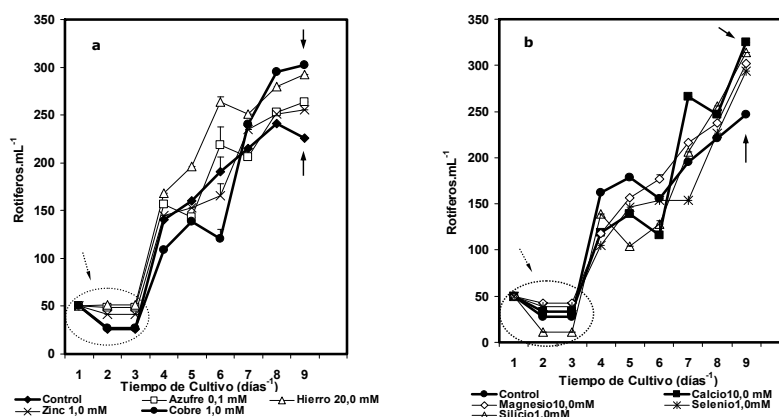


Figura 1. Evolución de la densidad de cultivo de *Brachionus plicatilis* (rotífero. mL^{-1}) alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada en semicontinuo, tasa de renovación 30% con diferentes elementos [mM].

El enriquecimiento con elementos en concentraciones óptimas ya citadas anteriormente, vía *Isochrysis galbana* var. T-iso originaron muy diferentes evoluciones en la densidad poblacional final de *Brachionus plicatilis*, las cuales fluctuaron en el caso del hierro, cobre, azufre y zinc con respecto a un control entre 225 y 302 rotíferos.mL⁻¹ en tanto que para el magnesio, calcio, silicio y selenio con respecto a un control oscilaron entre 246 y 325 rotíferos.mL⁻¹ *tablas 1-2 y figura 1*, resultados ligeramente superiores a los obtenidos alimentando con *Phaeodactylum tricornutum* (capítulo 3). Existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo mencionadas ($p<0,05$).

Ferreira 2006, alimentando rotíferos, empleando la misma microalga que el presente estudio cultivada con diferentes tasas de renovación e intensidad de luz moderada solo obtuvo entre 105 y 190 rotíferos.mL⁻¹. Schlosser and Anger, 1982; Lubzens, 1987; Miracle and Serra, 1989; Korstad *et al.*, 1989; Hirayama, 1990; Hiawa and Heerkloss, 1994, Patiño, 1995, mencionan que en *Brachionus plicatilis* existen diferentes factores como la temperatura, salinidad, aireación, tipo-tamaño-concentración y calidad del alimento los cuales afectan la ingestión y la multiplicación poblacional; en el presente estudio todos los anteriores parámetros fueron mantenidos constantes excepto la calidad del alimento microalgal vía el enriquecimiento con diferentes elementos, por lo que las condiciones de cultivo de la microalga determinaron la supervivencia, tamaño, metamorfosis así como la tasa de reproducción de los organismos filtradores alimentados con ellas; por lo tanto es lógico de pensar que esta calidad del alimento vía la nutrición mineral es la que afecta la ya citada generación poblacional como lo demostraron nuestros resultados.

Whyte and Nagata, 1990; Fulks and Main, 1992; Snell, 1991; Tamaru *et al.*, 1991; Nagata and Whyte, 1992, Vadstein *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 1997 concluyen que la tasa reproductiva es fuertemente afectada por el tipo y calidad del alimento proveído en su cultivo (Qi *et al.*, 2009), así como el tamaño de partícula y las especies de microalgas determinaran la tasa reproductiva de *Brachionus plicatilis* (Sayegh *et al.*, 2007; Hu and Xi, 2008; Alva-Martínez *et al.*, 2009). Luna-Andrade *et al.*, 2002 en su estudio combinado entre concentración de *Tetraselmis suecica* y cobre reporta valores de entre 36 y 251 rotíferos.mL⁻¹. Milione and Zeng 2007 evaluando el efecto de diferentes dietas microalgales sobre el crecimiento poblacional de *Acartia sinjiensis* obtienen altos rendimientos con *Isochrysis galbana* var. T-iso en comparación con *Nannocloropsis* sp, *Rhodomonas maculata* y *Tetraselmis chuii*.

Por otra parte la producción final de huevos.mL⁻¹ en el caso del hierro, cobre, azufre y zinc con respecto a un control osciló entre 50 y 96 huevos.mL⁻¹ (*tabla 1*) lo que corresponde a 0,27 y 0,54 huevos.hembra⁻¹ (*figura 2a*), en tanto que para el magnesio, calcio, silicio y selenio con respecto a un control fluctuaron entre 46 y 83 huevos.mL⁻¹ (*tabla 2*) lo que corresponde a 0,37 y 0,48 huevos.hembra⁻¹ (*figura 2a*), existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo mencionadas ($p<0,05$)

tablas 1-2. Se observó una menor eficiencia en la generación de huevos para el enriquecimiento con magnesio, calcio, silicio y selenio en la alimentación con *Phaeodactylum tricornutum* (capítulo 3). Ferreira 2006, alimentando rotíferos, empleando *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes tasas de renovación e intensidad de luz moderada, solo obtuvo entre 0,25 y 0,33 huevos.hembra⁻¹. Milione and Zeng, 2007 indican que en el copépodo *Acartia sinjiensis* una dieta en base a *Isochrysis galbana* var. T-iso produce un mayor rendimiento en la producción de huevos. Støttrup and McEvoy, 2003 mencionan que la proporción de huevos depende de la calidad de los alimentos. Cualquier desviación de las condiciones óptimas del alimento se refleja en bajas o altas tasas de producción de huevos en los cultivos de rotíferos. Por ejemplo, en un previo estudio, una proporción de huevos de menos de 0,13 para cultivos de *Brachionus plicatilis* indica inestabilidad y el colapso futuro posible del cultivo (Snell *et al.*,1987). La producción de huevos por hembra al final con respecto al elemento mostró grandes oscilaciones; tales resultados pueden ser debidos a la viabilidad de eclosión de los huevos amícticos dada la calidad alimenticia de la haptofita vía el elemento. En la *figura 2a* se pueden observar para el hierro, cobre, azufre y zinc tres picos máximos de producción de huevos en los días 2, 4 y 6 de cultivo, en el caso del magnesio, calcio, silicio y selenio *figura 2b* es posible distinguir de igual manera tres picos máximos de producción de huevos en los días 3, 5 y 7; resultados similares han sido descritos por Wullur *et al.*,2009 modificando la salinidad; datos que nos sugieren las siguientes generaciones poblacionales. Ito 1955; 1957; Wullur *et al.*,2009 indican que el ciclo de vida generacional es cercano a 4 días; sin embargo nuestros resultados revelan que vía la inclusión de ciertos elementos que modifican la calidad microalgal es posible incluso modificar la tasa generacional en *Brachionus plicatilis* una herramienta biotecnológica muy importante en la producción de alimento vivo para los siguientes niveles tróficos acuáticos. Motivo del ritmo circadiano 12L:12O al que fueron sometidos los cultivos de rotíferos, se pudo observar una gran uniformidad de tallas, así mismo un gran número de hembras a primera hora del ciclo de luz mostraron entre 3 y 5 huevos, posterior a ese periodo fue solo ocasional encontrar hembras con huevos, así mismo la uniformidad de tallas se perdió. Al respecto Camus and Zeng, 2008 mencionan que con el copépodo *Acartia sinjiensis* la producción de huevos y eclosión de los mismos es debida al efecto del fotoperiodo al que se someten los cultivos masivos; tal y como ocurrió en el presente estudio con *Brachionus plicatilis*. Los resultados del presente estudio han demostrado el claro efecto de la calidad de la dieta vía el enriquecimiento mineral en los parámetros relacionados con la productividad del rotífero. La producción de huevos es uno de los principales factores que determinan el crecimiento poblacional en copépodos calanoides, y esto es debido a la calidad de la dieta (Uye, 1981; Castro-Longoria, 2003; Ianora, 2005) como fue evidente en el presente estudio con *Brachionus plicatilis*; en particular en la proporción DHA/EPA de la dieta, como se podrá observar más adelante (Støttrup and Jensen, 1990; Kleppel *et al.*,2005; Lee *et al.*,2006).

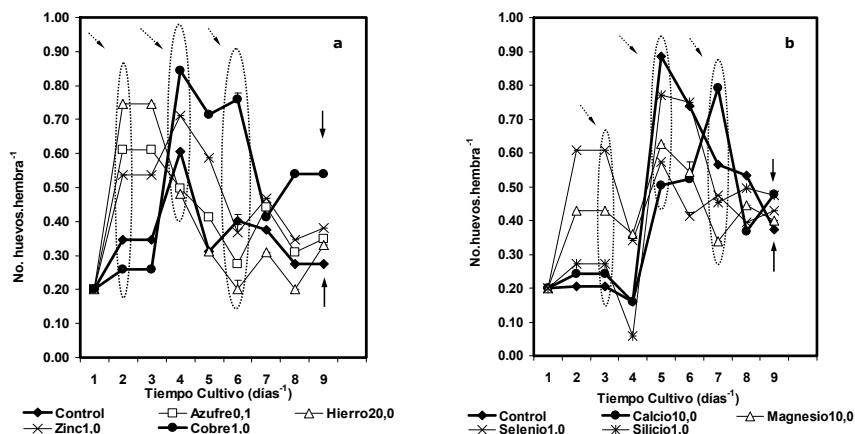


Figura 2. Evolución de la producción de huevos en *Brachionus plicatilis* (huevos.hembra⁻¹) alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada en semicontinuo, tasa de renovación 30% con diferentes elementos [mM].

Fábregas *et al.*, 1996b; 1998b indican que la tasa de renovación así como la concentración de nutrientes en efecto combinado en cultivos semicontinuos dan lugar a grandes diferencias en el valor nutritivo de *Phaeodactylum tricornutum*, tal y como fue evidente en los resultados obtenidos en el capítulo 3.

Se originaron los siguientes valores de tasa de crecimiento poblacional (*r*) para los rotíferos alimentados con *Isochrysis galbana* var. T-iso enriquecida con la concentración óptima de magnesio, calcio, silicio, selenio y control 0,22, 0,23, 0,23, 0,22 y 0,19.día⁻¹ respectivamente; en tanto que para el hierro, cobre, azufre y zinc con respecto a un control 0,22, 0,22, 0,21, 0,20 y 0,18 día⁻¹ correspondientemente. Ferreira 2006 con la misma microalga obtuvo valores por debajo en torno a 0,09 y 0,17. Algunos autores han obtenido tasas de crecimiento más altas en cultivos de rotífero (0,24 y 0,63) alimentados con otras especies de microalgas (Scott and Baynes, 1978; Yúfera and Pascual, 1983; Caric *et al.*, 1993; Luna-Andrade *et al.*, 2002; Wullur *et al.*, 2009; Alva-Martínez *et al.*, 2009), mencionando la mayoría de ellos un efecto de la especie de microalga, así como la salinidad; sin embargo Kostopoulou and Vadstein, 2007 indican que la especie de rotífero así como diferentes concentraciones de *Nannocloropsis oculata* pueden incluso duplicar lo reportado por otros autores en torno a 1,12 y 1,57.día⁻¹; por otra parte dada la oscilación que observaron nuestros resultados es evidente que los elementos ejercieron un diferente efecto sobre la calidad nutricional de *Isochrysis galbana* var. T-iso y que impacta en dicha tasa de crecimiento. La que a su vez está relacionada con la cantidad de alimento y dependiendo del tipo de dieta la cantidad requerida para alcanzar la multiplicación máxima (Yúfera *et al.*, 1983; Lubzens *et al.*, 1995; Ferreira 2006; Milione and Zeng, 2007). La tasa de crecimiento poblacional (*r*) de rotíferos generalmente es más alta que en cladóceros y copépodos (Allan, 1976). In general *r* varía entre especies de rotíferos desde 0,2 a 2,0 por día, dependiendo de la especie y cantidad del alimento adicionado (Sarma *et al.*, 2001), Hu and Xi, 2008, obtienen valores de entre 0,04 y 0,11 con diferentes dietas microalgales en el rotífero de agua dulce *Brachionus angularis*.

En lo que respecta a la tasa de conversión alimenticia (TCA) y porcentaje de eficiencia de crecimiento (%EC), por el rotífero alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso en las concentraciones de elementos conocidas; fue muy variable mostrando los siguientes valores para: magnesio(1,60-62%), calcio(1,49-67%), silicio(1,61-62%), selenio(1,36-74%) con respecto a un control(1,43-70%) indicándonos en ambos casos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre el magnesio y el silicio. En tanto que la TCA y %EC del rotífero con hierro, cobre, azufre y zinc con respecto a un control fue (1,97-51%), (1,50-66%), (1,37-73%), (1,98-50%) y (1,62-62%), existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre el hierro y el zinc. Los valores de TCA nos indican cuan eficiente es el rotífero para vía la microalga enriquecida con el elemento ganar peso, de modo, que tales valores entre mas cercanos a 1 sean o inferiores a 1, mejor será la TCA, la cual fue eficiente con calcio, selenio y cobre. En la mayoría de los casos el %EC es inferior al 100%. Mencionar que la TCA hallada en rotíferos alimentados con *Phaeodactylum tricornutum* fue más eficiente (capítulo 3) con respecto a *Isochrysis galbana* var. T-iso empleada como alimento con los mismos elementos empleados en su enriquecimiento. El comportamiento de las anteriores variables nos da una idea de cuan importantes son ciertos elementos en el tipo y calidad del alimento vivo vía la cadena trófica.

La inclusión de las concentraciones óptimas (capítulo 2) de magnesio, calcio, silicio, selenio, hierro, cobre, azufre y zinc con respecto a un control, para la máxima generación de biomasa celular en *Isochrysis galbana* var. T-iso, causaron diferentes efectos como alimento en la composición bioquímica de *Brachionus plicatilis* de la siguiente manera: la biomasa celular con magnesio, calcio, silicio y selenio mostró la siguiente disposición bioquímica **Carbohidratos>Proteínas>Lípidos**(pg.cel⁻¹), en tanto que en los rotíferos una vez consumida la microalga la disposición fue **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos**(ng.rotífero⁻¹) en la mayoría de los casos (figura 3 a-b); en el caso de la biomasa celular con hierro, cobre, azufre y zinc reveló la siguiente composición proximal **Proteínas>Carbohidratos>Lípidos** (pg.cel⁻¹), y una vez consumida la microalga por el rotífero **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos** (ng.rotífero⁻¹) en la totalidad de los casos (figura 3 c-d). Mismos comportamientos fueron observados empleando *Phaeodactylum tricornutum* (capítulo 3). Estudios similares han comparado la dieta y la composición del rotífero, conclusiones expresadas en términos de peso seco (Frolov *et al.*,1991; Fernández Reiriz *et al.*,1993; Reitan *et al.*,1997). Sin embargo los resultados de estos estudios son contradictorios; por ejemplo Frolov *et al.*,1991, obtiene una correlación positiva entre el contenido de proteína y lípidos del rotífero y su alimento, pero no existe correlación con los carbohidratos. Fernández Reiriz *et al.*,1993 encuentra una correlación rotífero-alimento en el contenido carbohidratos y lípidos pero no relación entre el contenido de proteínas. Al respecto Sayegh *et al.*,2007 mencionan que la composición del rotífero no es necesariamente el reflejo de composición de la dieta.

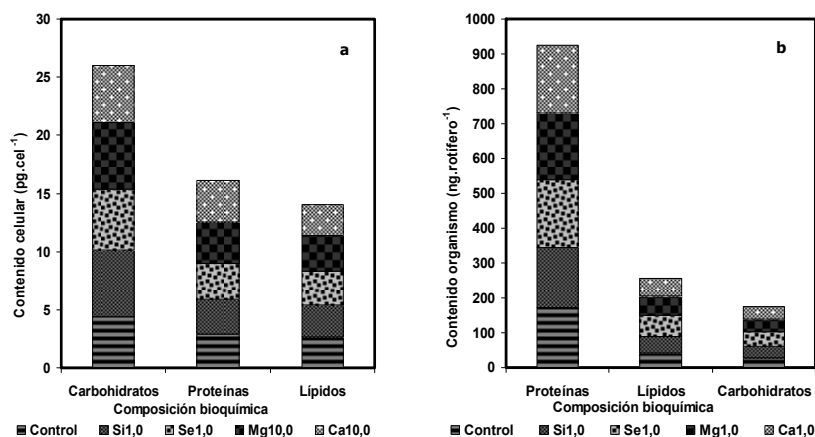


Figura 3.- Evolución de la composición bioquímica de *Isochrysis galbana* var. T-iso (**a**) (pg.cel^{-1}) y de *Brachionus plicatilis* (**b**) (ng.rotífero^{-1}) con respecto a Si^{4+} , Se^{2-} , Mg^{2+} , Ca^{2+} .

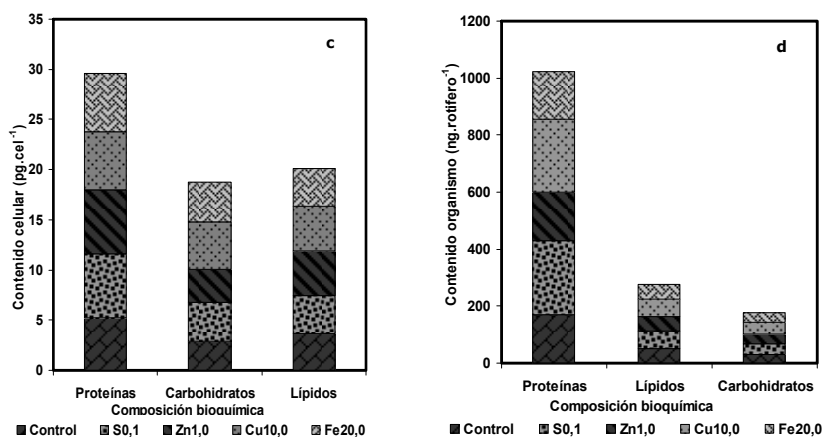


Figura 3.- Evolución de la composición bioquímica de *Isochrysis galbana* var. T-iso (**c**) (pg.cel^{-1}) y de *Brachionus plicatilis* (**d**) (ng.rotífero^{-1}) con respecto a Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , S^{2-} .

En orden de importancia energética, el contenido de proteína en el rotífero fue el mayor combustible bioquímico (*figura 3 b-d*), una vez cultivado con la microalga y concentraciones conocidas de magnesio, calcio, silicio, selenio y control, mostrando los siguientes valores: $191,01$, $193,42$, $173,12$, $195,86$ y $170,95 \text{ ng.rotífero}^{-1}$ comparativamente; existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$), excepto entre el magnesio y el calcio *tabla 1*. Por lo que respecta al hierro, cobre, azufre, zinc y control se obtuvo $168,29$, $255,55$, $260,14$, $170,07$ y $168,91 \text{ ng.rotífero}^{-1}$ respectivamente; existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre el hierro y el control (*tabla 2*). Contenidos de proteína que son comparativamente inferiores a los obtenidos con rotíferos alimentados con *Phaeodactylum tricornutum* (capítulo 3) con respecto a magnesio, calcio, silicio, selenio; en tanto que superiores con hierro, cobre, azufre, zinc (capítulo 3). Ferreira 2006, en su estudio sobre alimentación del rotífero *Brachionus plicatilis* con *Isochrysis galbana* var. T-iso con distintas tasas de renovación logra contenidos de proteína inferiores a el presente estudio en torno a 74 y $97 \text{ ng.rotífero}^{-1}$. Por

otra parte Sayegh *et al.*, 2007 solo obtiene valores entre 80 y 175 ng.rotífero⁻¹ empleando en la alimentación del rotífero diferentes cepas de *Isochrysis galbana*.

Por otra parte el segundo combustible, lo representó el contenido de lípidos (*figura 3 b-d*) que para el magnesio, calcio, silicio, selenio y control mostró 54,96, 51,24, 47,44, 60,07 y 42,22ng.rotífero⁻¹ (*tabla 1*), en tanto que para el hierro, cobre, azufre, zinc y control, reveló valores de 52,13, 63,06, 60,81, 50,97 y 50,49ng.rotífero⁻¹ respectivamente (*tabla 1*), indicando diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre el zinc y el control (*tabla 2*). Contenidos de lípidos que son comparativamente inferiores a los obtenidos con rotíferos alimentados con *Phaeodactylum tricornutum* (capítulo 3). Ferreira 2006, en su estudio sobre alimentación del rotífero *Brachionus plicatilis* con *Isochrysis galbana* var. T-iso con distintas tasa de renovación logra contenidos de lípidos inferiores a el presente estudio en torno a 36 y 56ng.rotífero⁻¹. Sayegh *et al.*, 2007 reporta contenido de lípidos en rotíferos cultivados con diferentes cepas de *Isochrysis galbana* con una oscilación entre 45 y 85 ng.rotífero⁻¹.

Por lo que respecta al contenido de carbohidratos (*figura 3 b-d*) valores de 37,55, 34,73, 31,98, 41,40 y 28,35ng.rotífero⁻¹ estuvieron presentes en magnesio, calcio, silicio, selenio y control comparativamente (*tabla 1*); así como 33,41, 40,44, 40,17, 32,76 y 29,70ng.rotífero⁻¹ en hierro, cobre, azufre, zinc y control; indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre hierro y zinc (*tabla 2*). Tales resultados son comparativamente inferiores a los obtenidos con rotíferos alimentados con *Phaeodactylum tricornutum* (capítulo 3). Ferreira 2006, en su estudio sobre alimentación del rotífero *Brachionus plicatilis* con la misma microalga logra valores de carbohidratos inferiores a el presente estudio en torno a 19 y 33ng.rotífero⁻¹. Sayegh *et al.*, 2007 reporta valores de 25 y 55ng.rotífero⁻¹.

Cuando el contenido de proteína se considera como porcentaje de la fracción orgánica, el valor de proteína según la concentración de enriquecimiento del elemento probado, fluctuó entre el 65,87 y 72,03% *figura 4 a-b* y *tabla 1-2*; superando dichos porcentajes los valores obtenidos con rotíferos alimentados con *Phaeodactylum tricornutum* (capítulo 3). Resultados que se consideran óptimos ya que Lubzens *et al.*, 1989; Frolov *et al.*, 1991; Frolov and Pankov, 1992; Nagata and Whyte, 1992; Fernández-Reiriz *et al.*, 1993; Reitan *et al.*, 1993; Rainuzzo *et al.*, 1997; Øie and Olsen, 1997; Makridis and Olsen, 1999, Lubzens *et al.*, 2001; Lubzens and Zmora, 2003 demuestran un rango de contenido de proteína en el rotífero, de entre el 28 y 63%. El contenido de proteína por rotífero puede incrementarse de un 60-80% cuando se incrementa la ración alimenticia. Ferreira, 2006 alimentando con *Isochrysis galbana* var. T-iso y diferentes tasas de renovación obtiene valores entre un 52 y 57%. Por lo que respecta a la fracción orgánica de los lípidos mostraron un rango de variación entre 16,84 y 20,27% *figura 4 a-b* y *tabla 1-2*, valores que son inferiores a los obtenidos con rotíferos alimentados con *Phaeodactylum tricornutum* (capítulo 3). Por otra parte Ferreira, 2006 obtiene valores entre 27,75 y 30,52%. Teshima *et al.*, 1987; Frolov *et al.*, 1991; Nagata and White, 1992; Fernández-Reiriz *et al.*, 1993; Rainuzzo *et al.*, 1997; Lubzens *et al.*, 2001; Lubzens and Zmora, 2003 mencionan que cerca

del 34-43% de los lípidos en rotíferos son fosfolípidos y un 20-55% son triacilgliceroles, con pequeñas concentraciones de monoacilgliceroles, diacilgliceroles, esteroides, ésteres esteroides, y ácidos grasos libres. Los fosfolípidos y triacilgliceroles muestran similares perfiles de ácidos grasos, pero estos son grandemente afectados por los lípidos proveídos en la alimentación del rotífero. El contenido lipídico de los rotíferos es generalmente más bajo que el del alimento, lo que indica que los lípidos son utilizados por los rotíferos. Los rotíferos utilizan proporciones altas de DHA para la reproducción (Øie and Olsen, 1997) así la utilización de los lípidos dependerá de la temperatura (Olsen *et al.*, 1993). Finalmente los carbohidratos revelaron un comportamiento entre 11,12 y 13,92%, el cual fue inferior al desempeño obtenido con rotíferos alimentados con *Phaeodactylum tricornutum* (ver capítulo 3); al respecto Whyte and Nagata, 1990; Frolov *et al.*, 1991; Frolov and Pankov, 1992; Nagata and Whyte, 1992; Fernández-Reiríz *et al.*, 1993; Lubzens and Zmora, 2003; Ferreira, 2006 demostraron un rango entre 10,5 y 27%. De donde el 61-80% es glucosa (como glicógeno), un 9-18% de ribosa y 0,8-7,0% de galactosa, manosa, deoxiglucosa, fucosa, y xilosa (Nagata and Whyte, 1992). La fracción orgánica hace más evidente la compartimentalización de los combustibles bioquímicos en *Brachionus plicatilis* además de ser evidente que la calidad del alimento vía la diversidad de elementos y el tipo de microalga promovió la calidad proximal del rotífero. Es sabido además que la ración alimenticia afecta la tasa reproductiva del rotífero y su contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos.

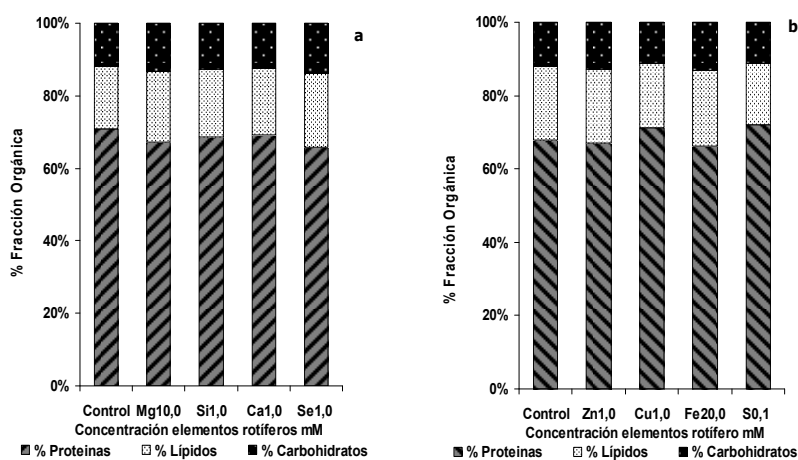


Figura 4.- Porcentajes de proteínas, lípidos y carbohidratos en *Brachionus plicatilis* respecto la concentración de elementos en *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo: **(a)** Si^{4+} , Se^{2-} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , **(b)** Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , S^{2-} .

En lo que se refiere al valor calórico (VC) por el rotífero con base en la calidad nutricional de *Isochrysis galbana* var. T-iso vía el magnesio, calcio, silicio, selenio y control mostró un rango de variación entre $62,49$ y $77,75 \times 10^{-7} \text{J} \cdot \text{rotífero}^{-1}$ indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) (tabla 1); en tanto que vía el hierro, cobre, azufre, zinc y control exhibió una oscilación entre $65,52$ y $93,23 \times 10^{-7} \text{J} \cdot \text{rotífero}^{-1}$ existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre el hierro y zinc (tabla 2). Tales resultados de VC se encontraron por debajo de los reportados en rotíferos alimentados con *Phaeodactylum tricornutum* (capítulo 3). Ferreira, 2006

alimentando con *Isochrysis galbana* var. T-iso y diferentes tasas de renovación obtiene valores entre $3,53$ y $5,51 \times 10^{-6}$ J.rotífero⁻¹ de VC. Fernández-Reiríz *et al.*,1993; Lubzens and Zmora, 2003, mencionan que el valor calórico encontrado en los rotíferos dependerá de la dieta en un rango de $13,4 \times 10^{-6}$ J.rotífero⁻¹ con levadura de cerveza y $20,0 \times 10^{-6}$ J.rotífero⁻¹ después de 6 h de enriquecimiento con boostings. Demostrando nuestros resultados que la calidad del alimento del rotífero vía el enriquecimiento mineral mediante la microalga mostró diversos grados de calidad en el VC del rotífero en cultivo.

En lo que atañe al peso seco por rotífero en base al elemento en la alimentación con magnesio, calcio, silicio, selenio y control fluctuó en el rango de 249,68 y 308,18 ng.rotífero⁻¹ (tabla 1), por otra parte con hierro, cobre, azufre, zinc y control oscilo entre 257,87 y 374,05 ng.rotífero⁻¹ (tabla 2); indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre el hierro y zinc. Valores de peso seco que se correspondieron con la evolución de el peso orgánico (proteínas+lípidos+carbohidratos ng.rotífero⁻¹) en el rango de 241,52-297,33 y 249,10-361,12 ng.rotífero⁻¹ respectivamente; y por ende con el contenido de materia orgánica por rotífero (tablas 1-2). Destacar que tales valores de peso seco se encontraron por debajo de los reportados en rotíferos alimentados con *Phaeodactylum tricornutum* (capítulo 3). Ferreira, 2006 en su estudio sobre alimentación con *Isochrysis galbana* var. T-iso consiguió entre 207,86 y 296,92 ng.rotífero⁻¹, resultados que son cercanos al presente estudio. Lubzens *et al.*,1989 mencionan en sus investigaciones con *Brachionus plicatilis* que su valor nutricional dependerá de su peso seco, valor calórico y composición bioquímica y que es reflejo de la cantidad y calidad de su alimento. Matsumoto *et al.*,2009 indican en sus estudios que diferentes concentraciones de zinc enriqueciendo rotíferos, mostraron inferir sobre el crecimiento del organismo ya que la longitud de la lorica varío entre los 229 y 247 µm.

El peso seco de un rotífero es muy variable, en la literatura es frecuente hallar valores entre 300 y 600 ng, por lo que es evidente que en base a calidad del alimento vía la concentración de los elementos probados en este estudio ejerció un efecto en la variación del peso seco por rotífero y no la ración diaria de *Isochrysis galbana* var. T-iso la cual siempre fue constante (30,000 cel.rotífero⁻¹) y que además satisficó las necesidades del rotífero. Lubzens *et al.*,1989 indican que el peso seco del rotífero dependerá por sobre todo del tamaño y estado nutricional. Yufera *et al.*,1997 demuestran que el peso seco de *Brachionus plicatilis* se encuentra dependiendo de la calidad del alimento y tasa reproductiva entre 600 y 800 nanogramos por individuo. Moreno-Garrido *et al.*,1999 han informado que microalgas previamente enriquecidas por 1 o 2 días con cobre influyen sobre el incremento en biomasa del rotífero. Sayegh *et al.*,2007 alimentando rotíferos con 4 diferentes cepas de *Isochrysis galbana* obtiene pesos secos en torno a 300 y 400 ng.rotífero⁻¹ donde el mejor peso lo obtuvo con *Isochrysis galbana* var. T-iso.

En cuanto al contenido de cenizas por rotífero como se puede observar en la *figura 5a* y *tabla 1* vario con respecto al elemento probado, de modo que con magnesio, calcio, silicio, selenio y control mostró un rango de oscilación entre 8,16 y 10,85ng.rotífero⁻¹ donde el mínimo valor lo represento el control y el máximo el selenio respectivamente; indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$). Cenizas generadas con hierro, cobre, azufre, zinc y control mostraron un contenido entre 8,77 y 12,99ng.rotífero⁻¹ donde el mínimo valor es representado por el control y el máximo por el cobre existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre el azufre y el cobre (*figura 5b* y *tabla 2*). Mencionar que los valores de cenizas de los rotíferos alimentados con *Isochrysis galbana* var. T-iso enriquecida, fueron inferiores a los reportados con *Phaeodactylum tricornutum* (capítulo 3). Matsumoto *et al.*,2009 demuestran en sus estudios de incorporación de zinc en *Brachionus plicatilis* que el incremento en concentración del elemento se ve reflejado en el aumento de cenizas en torno al 2,19 y 2,47%. En el presente estudio dependiendo de los elementos y su concentración el % de cenizas en el rotífero osciló entre un 2 y 7%.

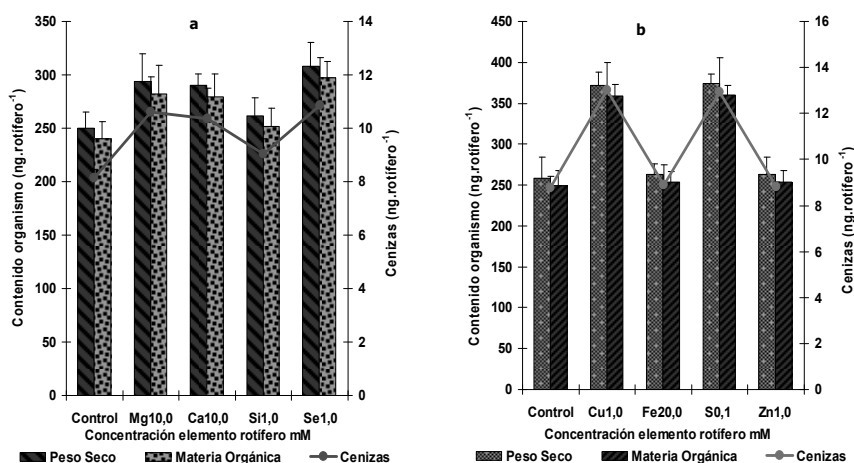


Figura 5.- Contenido organismo: peso seco, materia orgánica y cenizas (ng.rotífero⁻¹) respecto a la concentración de elementos en *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo: **(a)** Mg²⁺, Ca²⁺, Si⁴⁺, Se²⁻ **(b)** Fe³⁺, Cu²⁺ S²⁻, Zn²⁺. Media ± SD (n=3).

La incorporación independiente de Mg²⁺, Ca²⁺, Si⁴⁺, Se²⁻, Fe³⁺, S²⁻, Zn²⁺ y Cu²⁺ por *Brachionus plicatilis* vía *Isochrysis galbana* var. T-iso se puede observar en la *figura 6 a-b* y *tablas 3-4*; donde las cantidades de incorporación en el rotífero fueron muy variables lo que nos indica la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones ($p<0,05$), *tablas 3-4*. Tales diferencias concuerdan con los valores de cenizas reportados en todas las condiciones elementales, que además son evidentes en el comportamiento del peso seco y orgánico del rotífero vía el alimento.

Existe poca información sobre la composición mineral de los rotíferos así mismo sobre el efecto de la dieta sobre esta, pero algunos resultados sugieren que alimentar rotíferos con *Nannochloropsis* sp incrementa ligeramente su contenido de sodio, potasio, zinc, cobre y manganeso (Watanabe *et al.*, 1983). Ferreira, 2006 enriqueciendo rotíferos en periodos de 8 días con *Nannochloropsis gaditana* e *Isochrysis galbana* var. T-iso indica, que dependiendo de la microalga empleada será el grado de acumulación de diferentes macro y microelementos, además de que el contenido de estos tiende a incrementarse en la medida en que se aumenta la tasa de renovación en cultivos en semicontinuo, asimismo demuestra que en periodos de enriquecimiento por 24h con *Isochrysis galbana* var. T-iso es mayor el contenido de microelementos como el Mn, Cu, Cr, Co, Ni, Fe, Si, y de macroelementos como el Mg, K, Ca, S, P, y Zn; que en rotíferos cultivados con la misma microalga por 8 días. Normalmente poca atención se ha prestado a la nutrición mineral de organismos acuáticos, algunos autores no lo consideran un factor determinante del valor nutritivo de la dieta (Watanabe *et al.*, 1983). Sin embargo Robin, 1989 consiguió incrementar el crecimiento del rodaballo enriqueciendo rotíferos con una mezcla de minerales. La forma y concentración en la que se suministra un determinado elemento dada su importancia en procesos fisiológicos, metamórficos y de supervivencia es de crucial importancia en su bioacumulación a través de la cadena trófica. Ferreira, 2006 menciona en su disertación que es de relevante importancia tener en cuenta la biodisponibilidad de los elementos traza en el momento de formular los medios nutritivos ya que puede ser importante para mejorar la composición bioquímica de los organismos que forman parte de la cadena nutritiva en acuicultura, como resultado evidente en el presente estudio. Mencionar que como apunta Ferreira 2006, existieron diferencias en nuestros estudios en el grado de incorporación de los elementos por parte del rotífero alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso con respecto a *Phaeodactylum tricornutum* (capítulo 3) esto debido en parte a la diferencia que existe en el grado de enriquecimiento de los elementos por la microalga, las cuales mostraron diversas concentraciones óptimas para la generación de biomasa como se puede constatar en los capítulos 1 y 2, por lo que el nivel de enriquecimiento en la microalga difirió, mostrándose evidente en el rotífero. El cultivo y crecimiento de rotíferos en circunstancias artificiales, como las encontradas en las hatcheries de peces marinos puede conducir a la falta de concentraciones adecuadas de diversos elementos importantes en el rotífero como alimento vivo debido a la limitación en la variedad de alimentos disponibles. Moreno-Garrido *et al.*, 1998, 1999 informan que las microalgas acumulan grandes cantidades de elementos como el cobre el cual no segregan al medio de cultivo hasta después de algún tiempo. Por lo que Matsumoto *et al.*, 2009 mencionan que la microalga *Chlorella* enriquecida con zinc puede ser utilizada como material para el enriquecimiento de rotíferos, tal y como fue evidente en el presente estudio.

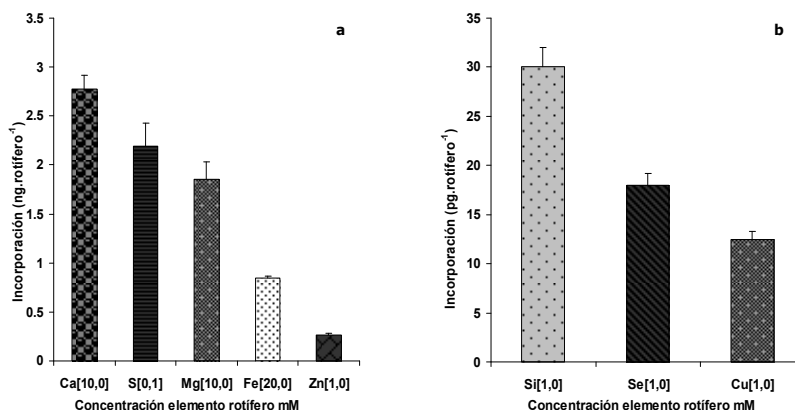


Figura 6.-Incorporación de elementos en *Brachionus plicatilis* alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso enriquecida con: **(a)** Ca^{2+} , S^{2-} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} **(b)** Si^{4+} , Se^{2-} , Cu^{2+} . Media \pm SD ($n=3$)

El contenido de ácidos grasos en *Brachionus plicatilis* mostró la misma tendencia que *Isochrysis galbana* var. T-iso (Ferreira, 2006), cultivada con diferentes concentraciones de elementos; donde los ácidos grasos (AG) más abundantes entre un 13 y 26% están representados por el 14:0, 16:0 y el 18:1(n-9), estimándose en conjunto en un 51,34-65,55% del total. Otros AG monoinsaturados y poliinsaturados de cadena corta entre un 5 y 9% son el 16:1(n-7), 18:0, 18:1(n-7), 18:2(n-6), 18:3(n-3), 18:4(n-3); en tanto ácidos grasos importantes con más de 20 carbonos que están presentes en un rango de 0,25-7,50% son el 20:4(n-6), 20:5(n-3), 22:5(n-3) y 22:6(n-3).

Cada elemento en el rotífero con la concentración ya descrita vía *Isochrysis galbana* var. T-iso (capítulo 2), mostró diversos grados de evolución respecto a incrementar o decrecer porcentualmente tales AG. Siendo un hecho que en base a la concentración del ácido mirístico (14:0), palmítico (16:0) y palmitoleico (16:1(n-7)) es que fue posible la elongación y desaturación de la cadena de carbonos de los ácidos grasos vía dos sistemas enzimáticos como la *acetyl-coA* y *ácido graso sintetasa* (Huang *et al.*, 2010) bondad característica de los rotíferos los cuales pueden sintetizar otros ácidos grasos *de novo* de cadena más larga, importantes y de concentración apreciable en el rotífero (Lubzens *et al.*, 1985; Gurr *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2009), como lo fueron el 18:0, 18:1(n-9), 18:1(n-7), 18:2(n-6), 18:3(n-3), 18:4(n-3) y 20:1(n-9) que originan series de otros AG insaturados de cadena aun más larga como el 20:4(n-6), 20:5(n-3), 22:5(n-3) y 22:6(n-3) (tabla 5-6). Reitan *et al.*, 1993 demostraron una mejoría significativa en el crecimiento, supervivencia y viabilidad de larvas de rodaballo a la metamorfosis, por la adición de determinadas microalgas ricas en ácidos grasos altamente poliinsaturados (PUFAs) a rotíferos. Sugiriendo que las microalgas contribuyen a la mejoría de los lípidos, especialmente el EPA y DHA, y el contenido en proteínas de los rotíferos (Øie *et al.*, 1997) ya que los rotíferos por naturaleza son pobres en los requerimientos de PUFAs para estadios larvales tempranos (Bell *et al.*, 2003). En el presente estudio destaca por su concentración el ácido graso docosahexaenoico (DHA) el cual es importante en equilibrio con el EPA y ARA (ácido araquidónico) en procesos de metamorfosis pigmentación y supervivencia en etapas

tempranas de desarrollo larval (Sargent *et al.*, 1995, 1997, 1999); el cual fue acumulado en mayor concentración en todos los elementos probados con respecto al control con los siguientes valores Mg^{2+} (5,66%), Ca^{2+} (5,20%), Si^{4+} (4,43%), Se^{2-} (4,40%), Control(1,54%) en tanto que con Fe^{3+} (7,50%), S^{2-} (4,68%), Zn^{2+} (5,13%), Cu^{2+} (6,03%), Control(3,07%) indicándonos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre el silicio y el selenio, *tablas 5-6*. La presencia de dicho AG obedeció a la desaturación y elongación del AG 22:5n-3 (docosapentaenoico) el cual mostró una concentración en el rango de 0,42 al 2,00% (*tablas 5-6*). Los valores de DHA según la concentración de los elementos evaluados en el presente estudio, se encuentran por debajo de los obtenidos por Ferreira, 2006 quien obtuvo valores en torno al 8 y 11% de DHA en *Brachionus plicatilis* alimentados con la misma microalga que el presente estudio con diferentes tasas de renovación e intensidad lumínica moderada. Es evidente que la constitución del medio de cultivo de la microalga trae consigo una gran variabilidad de sus lípidos totales así como de los AG totales específicamente el DHA. Matsumoto *et al.*, 2009 demuestran que altas concentraciones de zinc vía la cadena trófica disminuyen la concentración de DHA en el rotífero en torno al 8 y 6 %.

Los ácidos grasos pueden proveer de información sobre el tipo y calidad de dieta ingerida (Dalsgaard *et al.*, 2003). Matsumoto *et al.*, 2009 mencionan que la inclusión de determinadas cantidades zinc así como de otros elementos traza influyen sobre la riqueza de ácidos grasos de la microalga *Chlorella* que influye a su vez sobre la calidad del rotífero el cual además funciona como un vehículo para que el zinc cubra los requerimientos funcionales de larvas de peces marinos, así como supervivencia (Hamre *et al.*, 2008) con elementos como el yodo y selenio los cuales incrementan la concentración de los ácidos grasos en el rotífero. Johnston *et al.*, 2008 indican la importancia de la nutrición mineral de elementos como el calcio, cobalto, cobre, hierro, magnesio, manganeso, zinc, en todo el ciclo biológico de peces marinos sobre la calidad de huevos vía la vitelogenina lo que produce huevos con mejores perfiles de PUFAs.

El contenido de AGT $ng.rotífero^{-1}$ que correspondió, del contenido lipídico de *Brachionus plicatilis* alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso por elemento fue el siguiente: Mg^{2+} (32,06%), Ca^{2+} (33,72%), Si^{4+} (36,66%), Se^{2-} (30,68%), Control(35,74%) en tanto que con Fe^{3+} (26,03%), S^{2-} (30,13%), Zn^{2+} (43,95%), Cu^{2+} (28,62%), Control(27,29%). Valores que se encuentran ligeramente por debajo de los encontrados en la dieta (capítulo 2) los cuales oscilaron entre un 21,17 y 56,80%. Observar que el contenido de AGT de rotíferos enriquecidos vía *Phaeodactylum tricornutum* con cobre y hierro duplicaron su contenido (capítulo 3), con respecto a los valores obtenidos con los mismos elementos alimentando con *Isochrysis galbana* var T-iso. Respecto a tales porcentajes autores como Teshima *et al.*, 1987; Frolov *et al.*, 1991; Nagata and White, 1992; Fernández-Reiriz *et al.*, 1993; Rainuzzo *et al.*, 1997; Lubzens *et al.*, 2001, mencionan que cerca del 34-43% de los lípidos en rotíferos son fosfolípidos y un 20-55% son triacilglicerol, con pequeñas concentraciones de monoacilglicerol, diacilglicerol, esterol, esterol esterol, y ácidos grasos libres. Los fosfolípidos y triacilglicerol muestran similares perfiles de ácidos grasos, pero estos son grandemente afectados por los lípidos proveídos en la alimentación del rotífero.

Volkman *et al.*, 1989 y Devos *et al.*, 2006 mencionan que tales porcentajes de AG respecto de los AGT son debidos a que *Isochrysis galbana* var. T-iso presenta una gran variedad de clases de lípidos (lípidos neutros, glucolípidos y fosfolípidos) por lo que una gran parte de estos son lípidos no formados por ácidos grasos (no acílicos), tales como esteroides, hidrocarburos, alquenonas o pigmentos. Lípidos no formados por ácidos grasos que más contribuyen al contenido lipídico en esta haptofita son las alquenonas, metil y etilalquenonas, alquenoatos, y alquenos de cadena larga entre 36 y 39 carbonos, frecuentemente con dobles enlaces (Volkman *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1993; Versteegh *et al.*, 2001; Eltgoth *et al.*, 2005). Los perfiles de ácidos grasos de los lípidos tanto neutros y fracciones glucolípidicas no son muy diferentes de la fracción lipídica total. Sin embargo, la fracción de fosfolípidos la mas importante muestra una muy diferente composición de ácidos grasos (Tocher *et al.*, 2008). Devos *et al.*, 2006 indican que una vez cuantificado la concentración de DHA en las diferentes clases de lípidos se pudo observar que los fosfolípidos representan 75% del DHA total por célula. Dicha fracción relativamente baja de ácidos grasos, probablemente puede explicarse por altas fracciones de ácidos grasos inusuales, junto con un alto contenido de lípidos no formadores de ácidos grasos (Kayama *et al.*, 1989). Es en base a nuestros resultados que observamos cuan importante y variable resulta ser la inclusión de diferentes elementos en la modificación del perfil bioquímico en la cadena trófica.

Se observaron importantes diferencias en la evolución porcentual y ng.rotífero⁻¹ de los ácidos grasos saturados (AGS entre 37 y 53,31%) mas los monoinsaturados (AGM entre 28,01 y 32,40%) con respecto a los poliinsaturados (AGP 16,74 y 30,60%), indicándonos la existencia en los dos casos, de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto al control ($p<0,05$), ver figuras 7 a-b y tablas 5-6. El enriquecimiento vía la cadena trófica resulto ser eficiente en la generación de AGP con magnesio, cobre y azufre.

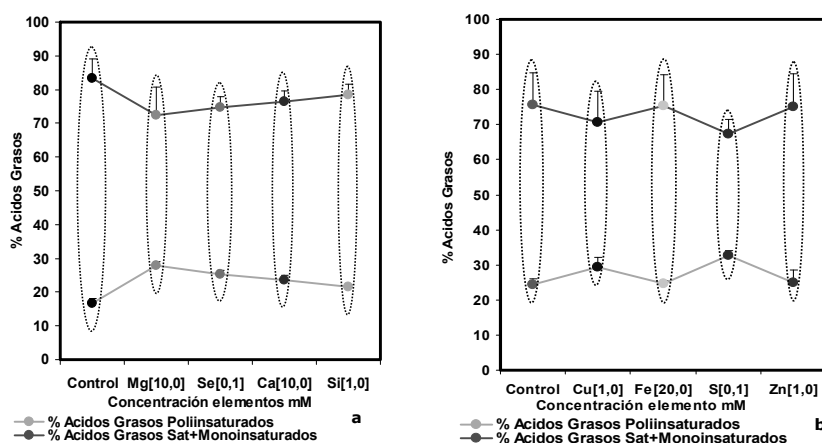


Figura 7.- Evolución porcentual del contenido de ácidos grasos en *Brachionus plicatilis* alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo con: **(a)** Ca²⁺, Se²⁻, Si⁴⁺, Mg²⁺, **(b)** S²⁻, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺. Media ± SD (n=3)

Dentro del grupo de los ácidos grasos poliinsaturados se encuentran tres grandes familias, mediante las cuales se derivan los procesos de elongación a ácidos grasos de cadena larga como son la **serie ω-9, ω-6 y ω-3**; de los cuales las series importantes son la ω-3 y ω-6, así mismo la proporción entre estas dos series es de relevante importancia en el

valor energético en cada uno de los niveles tróficos, aspecto que se ha descuidado en la nutrición de organismos marinos (Estévez *et al.*, 1999), por lo que una mayor proporción de los ω -3 en la cadena trófica es imprescindible en efectivos mecanismos formadores de membrana durante la metamorfosis de organismos marinos (Reitan *et al.*, 1994; Estévez and Kanazawa, 1995). Es así que las proporciones de ácidos grasos ω -3: ω -6 por rotífero mostraron diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación con respecto al control ($p<0,05$) ver *tablas* 5 y 6. La proporción porcentual de los AG ω -3: ω -6 en los elementos estudiados se encontró entre 1,04:1 y 1,87:1 (*tabla* 5-6). Donde el enriquecimiento con calcio, cobre y hierro en *Brachionus plicatilis* mostró las mejores proporciones. Indicar que la razón ω -3: ω -6 en rotíferos enriquecidos elementalmente vía *Phaeodactylum tricornutum* mostraron el doble de eficiencia en torno a 2,24:1 y 4,32:1, (capítulo 3).

Un aspecto importante desde el punto de vista nutricional en niveles superiores de la trama trófica alimenticia; es la proporción que existe del total de los ácidos grasos, el ácido docosahexaenoico (22:6n-3 DHA), eicosapentaenoico (20:5n-3 EPA) y el ácido araquidónico (20:4n-6 ARA), tal proporción DHA:EPA:ARA es muy importante en la alimentación de las primeras etapas de desarrollo larval, debido a que son los mayores fosfolípidos componentes de membranas. Estos ácidos grasos son necesarios para un apropiado desarrollo neural de la retina y cerebro (Sargent *et al.*, 1997, 1999b; Benítez-Santana *et al.*, 2007) y jugar un papel esencial en la metamorfosis, pigmentación y resistencia al estrés en larvas de peces marinos (Kanazawa, 1997; Rainuzzo *et al.*, 1997; Watanabe and Kiron, 1994; Weirich and Reigh, 2001; Bell *et al.*, 2003).

En los peces planos, la metamorfosis y el desarrollo de la pigmentación son controlados a nivel nervioso y neuroendocrinológico. En consecuencia, la producción anormal de eicosanoides en el cerebro como resultado de la alteración de los niveles de ARA y EPA trae consigo graves consecuencias para el desarrollo y la metamorfosis de las larvas de peces planos, incluyendo su anormal pigmentación; por lo que la proporción de DHA:EPA que promueve la formación de membranas a nivel celular sobre la proporción de ARA deberá ser siempre superior (Estévez *et al.*, 1999; Sargent *et al.*, 1999; Bell *et al.*, 2003).

En *Brachionus plicatilis* motivo de la inclusión de diferentes concentraciones de Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} mediante la microalga *Isochrysis galbana* var. T-iso logramos modificar la proporción DHA:ARA en el rango de 0,77:1% al 1,58:1% como se puede observar en las *tablas* 5-6 existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto a el control ($p<0,05$) Estévez *et al.*, 1999 encuentra una clara relación en la proporción DHA:ARA de los lípidos totales del cerebro de larvas de rodaballo sobre el porcentaje de pigmentación indicando que a mayores razones DHA:ARA mejor será la pigmentación a nivel larval. Cavalin and Weirich, 2009 lograron una mejor transformación y supervivencia larvaria de peces marinos con rotíferos alimentados con *Isochrysis* sp en una proporción DHA:ARA de 1,37:1%. Matsumoto *et al.*, 2009 en estudios de enriquecimiento en rotíferos con diferentes concentraciones de zinc vía *Chlorella* obtiene proporciones DHA:ARA entre 7,21 y 7,66:1%, en tanto que Hamre *et*

al., 2008 enriqueciendo rotíferos de manera directa con una mezcla de yodo y selenio obtiene valores de 11,66:1% los cuales mejoraron significativamente la supervivencia en larvas de *Gadus morhua*, observándose además que existe un incremento de los micronutrientes de las larvas en respuesta al enriquecimiento con selenio vía *Brachionus plicatilis*. Relaciones descritas en la presente disertación cubren eficientemente tales necesidades mediante los rotíferos modificados por la alimentación con diferentes concentraciones de elementos, resultando que la adecuada nutrición mineral vía la cadena trófica resulta una excelente herramienta biotecnológica en la modificación del alimento vivo.

La diversidad de elementos y sus concentraciones ya conocidas de igual modo ejercieron efecto en la relación DHA:EPA del rotífero la cual se encontró en un rango entre 5,50:1 y 12,28:1; indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto a el control ($p<0,05$) ver *tablas 5-6*.

Los peces marinos contienen grandes cantidades de ácido docosahexaenoico (22:6 n-3 DHA) eicosapentaenoico (20:5n-3 EPA) en los fosfolípidos de las membranas celulares. Los peces marinos no pueden biosintetizar DHA *de novo*, ni de los precursores de cadena más corta, como es el ácido alfa-linolénico (18:3 n-3). Por lo tanto, DHA y EPA serán componentes esenciales de la dieta en los peces marinos. El DHA está presente en concentraciones muy elevadas en las membranas de células neuronales y visuales, particularmente en las membranas celulares externas así como membranas sinaptosomales, en peces como en mamíferos (Sargent *et al.*, 1997, 1999; Koven *et al.*, 2001; Anderson and De Silva, 2003).

Por lo tanto, una insuficiencia de DHA en la dieta en etapas larvales tempranas de peces marinos es que puede perjudicar el desarrollo neurológico y visual con graves consecuencias para una serie de procesos fisiológicos y de comportamiento incluyendo los que dependen neuroendocrinológicamente.

Pigmentación anormal es común en los cultivos de larvas de peces planos marinos, y se puede mejorar sustancialmente rectificando el nivel de DHA en las larvas mediante el alimento vivo (Kanazawa *et al.*, 1981; Kanazawa, 1993; Reitan *et al.*, 1994b; McEvoy *et al.*, 1998b). Se ha considerado que la mal pigmentación puede ser consecuencia de un mal funcionamiento neuronal o visual, por ejemplo, de procesamiento anormal de las señales visuales, ya sea en el propio ojo, o posteriormente en el cerebro, desde la producción anormal de la hormona estimulante de melanocitos en el cerebro, de frente a perturbaciones en las conexiones sinápticas entre los nervios y el melanóforos en la piel. El síndrome de mal pigmentación es causado por una deficiencia de DHA o un exceso de EPA, por lo que diversos autores han documentado la importancia de una alta razón DHA:EPA (Kraul, 1993; Mourente *et al.*, 1993; Reitan *et al.*, 1994b; Lavens *et al.*, 1995).

Destacar que la proporción **DHA/EPA** encontrada en los rotíferos con la mayoría de los elementos aquí estudiados supera lo reportado por Reitan *et al.*, 1994b en Sargent *et al.*, 1999 donde logran eliminar la mal pigmentación de larvas de rodaballo incluyendo aceite refinado de atún rico en DHA en proporción **DHA/EPA** $\geq 2:1\%$. Es de destacar que esta es esencialmente la misma proporción de DHA/EPA que existe en la yema de los muchos huevos y larvas de peces marinos (Tocher and Sargent, 1984). Rodríguez *et al.*, 1997

observaron significativamente una alta tasa de crecimiento en larvas de sea bream alimentadas con rotíferos con relaciones DHA/EPA 1,5:1% con respecto a larvas alimentadas con razones 0,6:1%

Sui *et al.*, 2007 observó que en larvas de cangrejo chino *Eriocheir sinensis* proporciones dietarias DHA/EPA de 0,68:0,28 mostraban un inferior desarrollo larval y supervivencia con respecto a tratamientos con altas proporciones dietarias DHA/EPA de 2,85:1,17; lo que indica que altos niveles de ácidos grasos altamente poliinsaturados y en correcto balance DHA y EPA mejoran la respuesta larval al estrés. Por otra parte George *et al.*, 2008 empleando a la microalga *Isochrysis galbana* var. T-iso como dieta en el cultivo de larvas del equinodermo *Dendraster excentricus* obtuvieron buen crecimiento, metamorfosis y desarrollo con proporciones DHA/EPA 7,43:1%. Por otra parte Ferreira 2006, alimentando rotíferos con *Isochrysis galbana* var. T-iso con diferentes tasas de renovación solo obtuvo valores entre 2,09 y 4,93:1% valores tres veces por debajo de los obtenidos en el presente estudio. Hamre *et al.*, 2008 enriqueciendo rotíferos con una mezcla de yodo y selenio logra una proporción DHA/EPA de 1,7:1%. Roo *et al.*, 2009 mencionan que enriqueciendo rotíferos con DHA de manera que este se encuentre entre el 1,8 y 4,7% del total AGT en el rotífero es posible inhibir la presencia de deformidades esqueléticas en *Pagrus pagrus*.

Artemia franciscana

La evolución de la tasa de alimentación de *Artemia franciscana* con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo con diferentes elementos, desde metanauplio (1 Día Después de la Eclosión DDE) a preadulto (6-7 DDE), finalizando con el proceso de apareamiento (8-9 DDE) mostró un incremento en la ración alimenticia diaria de $0,3 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$ a $4,28 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$ por organismo (*figura 8 a-b*), comportamiento similar fue descrito por Evjemo *et al.*, 2000 evaluando la cinética de asimilación de *Isochrysis galbana* var. T-iso en diferentes estadios de crecimiento de *Artemia*; lo cual dependió de la transparencia del medio de cultivo, de esta manera todo el alimento adicionado diariamente fue ingerido por *Artemia* (Abreu-Grobois *et al.*, 1991; Sorgeloos *et al.*, 1994). Se observó entre el día 1 y 3 de cultivo una lenta filtración de la ración alimenticia, corroborada en el conteo celular y transparencia en el medio de cultivo. Tal comportamiento pudo ser debido por manipulación, causante de estrés en el organismo, un factor más la ración alimenticia, la cual pudo haber sido excedida en esos tres primeros días de cultivo y estar por encima de la tasa de ingestión óptima de ese estadio de crecimiento (Evjemo *et al.*, 2000); al respecto D'Agostino, 1980; Patiño, 1995 recomiendan una ración alimenticia inicial de 25µg de microalgas (peso seco x metanauplio de *Artemia*), aunque en el presente estudio se administro en el inicio entre 3,95 y 7,54µg de microalgas por organismo debido al peso seco celular de *Isochrysis galbana* var. T-iso enriquecida con diferentes elementos (*tablas 7-8*), considerando lo descrito por Nimura 1963; Nimura *et al.*, 1994 los cuales mencionan que elevadas tasas de ingestión pueden retrasar el crecimiento de *Artemia*. Ulterior a este periodo (*figura 8 a-b*) la tasa de filtración de *Artemia franciscana* se incremento de forma casi lineal.

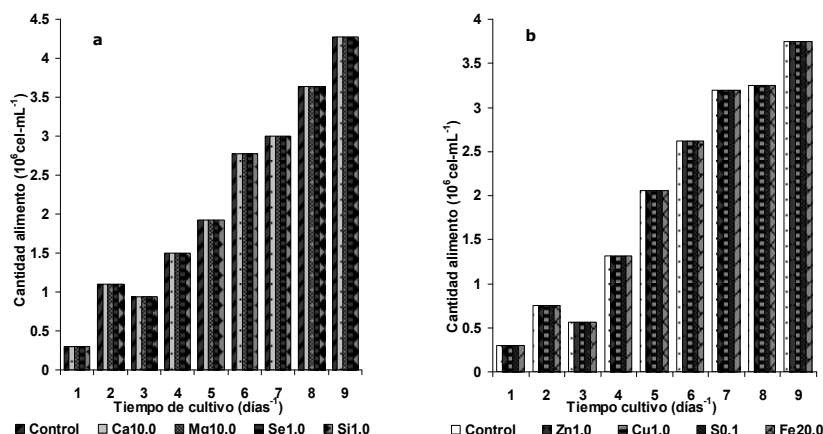


Figura 8.- Evolución del consumo (10^6 cel.mL^{-1}) de *Isochrysis galbana* var. T-iso (cultivada con diferentes elementos) por *Artemia franciscana*: **(a)** Ca^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Mg^{2+} , **(b)** S^{2-} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} .

Respecto a la supervivencia de *Artemia* al T_9 alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso enriquecida con magnesio, calcio, silicio y selenio, mostró diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto a el control ($p<0,05$) ver figura 9a; encontrándose en el rango entre el 67 y 75%; indicar que tal rango de supervivencia fue ligeramente inferior a lo reportado en *Artemia* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* enriquecida con los mismos elementos (capítulo 3) en torno al 66-83%. En tanto que con hierro, azufre, zinc y cobre al T_9 estuvo entre el 72 y 98% indicándonos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto a el control ($p<0,05$) ver figura 9b. Supervivencias que fueron levemente superiores a las encontradas alimentando con *Phaeodactylum tricornutum* (capítulo 3). Evjemo and Olsen 1999; Lora-Vilchis *et al.*,2004 con *Isochrysis galbana* var. T-iso y la diatomea *Chaetoceros gracilis* obtiene una supervivencia entre el 86% y 93%. En tanto que Seixas *et al.*,2009; Ronsón-Paulín *et al.*,2009 con diferentes microalgas obtienen porcentajes en torno al 18 y 88%. Por otra parte Dhont and Van Stappen, 2003 indican en diversos sistemas de cultivo en los mismos tiempos que el presente estudio, supervivencias en torno al 45 y 82%. Por otra parte Anh *et al.*,2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes al día 11 de cultivo mostró supervivencias entre 52 y 54%. La variabilidad en la supervivencia de *Artemia franciscana* dependió como se puede observar del enriquecimiento y calidad de la microalga con que fue alimentada, la cual además influyo en el tiempo en el cual *Artemia* llego a su etapa adulta (6-7 DDE) y con ella al apareamiento (8-9 DDE) del 100% de los adultos, donde las hembras ya poseían desarrollado el ovisaco. Anh *et al.*,2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes demostró al día 14 de cultivo una tasa de maduración entre el 95,2 y 99,7%.

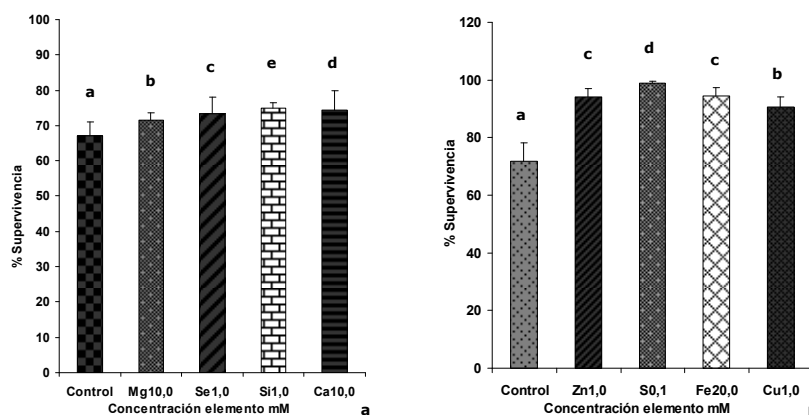


Figura 9.- Supervivencia de *Artemia franciscana* alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso (cultivada y enriquecida con diferentes elementos): **(a)** Ca^{2+} , Mg^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , **(b)** S^{2-} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} . Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$)

Por lo que se refiere a la longitud total (LT) alcanzada por los adultos de los diferentes tratamientos al T_9 se observó que con magnesio, calcio, silicio y selenio mostró un tamaño entre 4,44 y 4,71 mm^{-1} por organismo no existiendo diferencias significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto a el control ($p<0,05$) ver figura 10a; mencionar que tal LT, fueron inferiores a las reportadas con adultos alimentados con *Phaeodactylum tricornutum* con el mismo enriquecimiento de elementos (capítulo 3) en torno a 6,16 y 6,81 mm^{-1} por organismo. En cuanto a el hierro, azufre, zinc y cobre al T_9 la LT exhibió diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto a el control ($p<0,05$) ver figura 10b en el rango de 3,46 y 5,20 mm^{-1} por adulto de *Artemia*; resultados que fueron también inferiores a los encontrados en adultos alimentados con *Phaeodactylum tricornutum* con el mismo enriquecimiento de elementos (capítulo 3) en torno a 6,04 y 9,33 mm^{-1} por organismo. Sin embargo superiores a los 5,00 mm^{-1} reportados por Evjemo and Olsen 1999, en 8 días de cultivo con *I. galbana* var. T-iso, Lora-Vilchis *et al.*,2004 alimentando *Artemia* por 7 días con *Isochrysis galbana* var. T-iso obtuvo tallas de solo 4,2 mm^{-1} . En tanto que Seixas *et al.*,2009 alimentando con *Rhodomonas lens*, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana* y *Nannocloropsis gaditana* al T_8 obtuvo LT en torno a 1,5 y 4,9 mm^{-1} . Por otra parte Anh *et al.*,2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes demostró valores superiores a los nuestros pero al día 14 de cultivo, demostrando LT en el rango de 8,8 y 9,4mm, en tanto que Ronsón-Paulín *et al.*,2009 al día 14 de cultivo con *Tetraselmis suecica*, *Nannocloropsis* sp y mezcla de estas con y sin probióticos obtiene tallas entre 5,2 y 7,65 mm por individuo. Sin embargo Dhont and Van Stappen, 2003 citan que después de 2 semanas de cultivo con diferentes dietas vivas o inertes es posible que los preadultos o adultos de *Artemia* en promedio posean una longitud de 5 mm. Fábregas *et al.*,1996, 1998; Evjemo and Olsen, 1999, señalan que diferentes concentraciones de alimento influyen sobre el crecimiento y la reproducción de *Artemia franciscana*; en el presente estudio para todos los elementos probados, las tasas de alimentación fueron las mismas (300,000 cel.organismo $^{-1}$ Nimura, 1980), alterando solo la calidad de la dieta vía el enriquecimiento con los elementos, lo que nos demostró que la variabilidad de tallas es reflejo de la diversidad en la nutrición mineral.

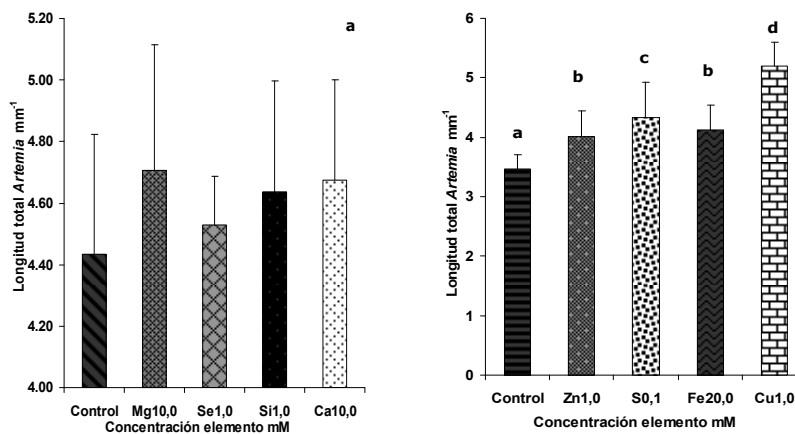


Figura 10.- Longitud total (mm) de *Artemia franciscana* alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso (cultivada y enriquecida con diferentes elementos): **(a)** Ca^{2+} , Mg^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , **(b)** S^{2-} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} . Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$)

En lo que se refiere a la tasa de conversión alimenticia (TCA) y porcentaje de eficiencia de crecimiento (%EC), por *Artemia* al tiempo T_9 , alimentadas con *Isochrysis galbana* var. T-iso enriquecida en las concentraciones de elementos ya conocidas, fue muy variable mostrando los siguientes valores : magnesio(2,96-33,71%), calcio(1,87-53,39%), silicio(3,07-32,48%), selenio(1,67-60,02%) y control(2,11-47,35%) indicándonos en ambos casos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$). En tanto que la TCA y %EC de *Artemia* con hierro, cobre, azufre y zinc con respecto al control fue de (2,74-36,40%), (1,71-58,46%), (1,37-72,95%), (2,75-36,37%) y (2,22-45,00%) respectivamente, indicándonos en ambos casos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$); resaltar que tanto los valores de TCA y %EC en todos los anteriores casos resultaron ser más eficientes que los reportados empleando *Phaeodactylum tricornutum* como alimento con el mismo enriquecimiento elemental (capítulo 3). Los valores de TCA nos indican cuan eficiente es *Artemia* vía la microalga enriquecida con el elemento para ganar peso o crecer; Lora-Vilchis *et al.*, 2004 alimentando con *Isochrysis galbana* var. T-iso obtiene una TCA de 3,60 (con una cantidad de alimento acumulado en los 7 días de cultivo de 557,5 μg con respecto a los 234,06-489,48 μg en 9 días del presente estudio) valor de eficiencia alto con respecto a los demostrados en el actual estudio. Sin embargo Seixas *et al.*, 2009 alimentando con *Rhodomonas lens* y *Tetraselmis suecica* obtiene mayores TCA entre 6,5 y 6,2 respectivamente. El comportamiento de las anteriores variables nos da una idea de cuan importantes son ciertos elementos en la calidad del alimento vía la cadena trófica y su desempeño nutricional sobre variables operacionales de cultivo.

La calidad de *Isochrysis galbana* var. T-iso debida al enriquecimiento con diferentes elementos en concentraciones conocidas, demostró diferentes velocidades de crecimiento (VC) en *Artemia* (mm.día⁻¹): magnesio-0,52, calcio-0,52, silicio-0,51, selenio-0,50, control-0,49, no existiendo diferencias significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$). En tanto que con hierro-0,46, cobre-0,58, zinc-0,44, azufre-0,48,

control-0,38 la oscilación demostró la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$). Las mejores velocidades de crecimiento se obtuvieron con magnesio, calcio y cobre; mencionar que alimentando con *Phaeodactylum tricornutum* con el mismo enriquecimiento en elementos (capítulo 3) la VC fue mucho más eficiente. Lora-Vilchis *et al.*, 2004 en su estudio sobre la tasa de crecimiento en *Artemia* con diferentes dietas obtiene con *Isochrysis galbana* var. T-iso velocidades de crecimiento muy cercanas a nuestros resultados en el rango de 0,32 y 0,96 mm.día⁻¹. Evjemo and Olsen, 1999 en 7 días de crecimiento alimentando *Artemia* con la misma microalga que el presente estudio obtiene una VC media de 0,59. Sick 1976 indica que altas VC en *Artemia* alimentada con *Dunaliella viridis* son debidas a la ausencia de pared celular y al alto contenido de proteína celular y contenido energético, situación similar ocurre con *Isochrysis galbana* var. T-iso; sin embargo no son las únicas razones por las cuales el alto valor alimenticio de una microalga, debiéndose agregar que en el presente estudio el enriquecimiento mineral de la dieta es un factor más el cual influye en el valor alimenticio de la dieta y por ende en el siguiente nivel trófico.

El peso seco ganado por los adultos de *Artemia franciscana* en base al elemento en la alimentación fue muy variable de modo que con magnesio, calcio, silicio, selenio y control osciló al T₉ entre 126,69 y 183,04µg.artemia⁻¹ (tabla 6), por otra parte con hierro, cobre, azufre, zinc y control al T₉ oscilo entre 105,58 y 200,09µg.artemia⁻¹ (tabla 7); indicándonos en todos los casos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$). Tales valores de peso seco, se corresponden con la evolución de el peso orgánico (proteínas+lípidos+carbohidratos µg.Artemia⁻¹) en el rango de 119,41-172,13 y 99,51-188,95µg.Artemia⁻¹ respectivamente; y por ende con el contenido de materia orgánica por adulto de *Artemia* (tablas 6-7); dichos resultados se encuentran por debajo de los encontrados con *Phaeodactylum tricornutum* con el mismo enriquecimiento mineral (capítulo 3). Lora-Vilchis *et al.*, 2004 alimentando *Artemia* con *Isochrysis galbana* var. T-iso obtuvo al día 7 solo un peso orgánico de 137,8µg.Artemia⁻¹, Seixas *et al.*, 2009 alimentando con *Nannocloropsis gaditana*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* y *Rhodomonas lens* al T₈ obtuvo pesos entre 25,7 y 111,2 µg.Artemia⁻¹. Evjemo and Olsen, 1999 alimentando *Artemia* con *Isochrysis galbana* var. T-iso por 11 días obtiene un peso seco de 195 µg.Artemia⁻¹. Por otra parte Anh *et al.*, 2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes al día 5 de cultivo obtiene pesos entre 310 y 320µg.Artemia⁻¹. Ronsón-Paulín *et al.*, 2009 al día 14 de cultivo con *Tetraselmis suecica*, *Nannocloropsis* sp y mezcla de estas con y sin probióticos obtiene pesos entre 140 y 470µg.Artemia⁻¹. Resultados que nos indican que la variabilidad en la calidad nutritiva de la microalga influyen en la nutrición y crecimiento del organismo; calidad nutricional que en nuestro estudio fue posible modificar vía el enriquecimiento mineral de la microalga lo que impacto en el desempeño nutricional de *Artemia* para la generación de peso.

Respecto al contenido de cenizas por adulto de *Artemia* como se puede observar en la figura 11a y tabla 6 vario con respecto al enriquecimiento del elemento en *Isochrysis galbana* var. T-iso, de modo que con magnesio, calcio, silicio, selenio y control mostró un

rango de oscilación entre 7,28 y 10,91 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ donde el mínimo valor lo represento el control y el máximo el selenio respectivamente; indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$). Cenizas generadas con hierro, cobre, azufre, zinc y control mostraron un contenido entre 6,07 y 11,15 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ donde el mínimo valor es representado por el control y el máximo por el azufre existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) (figura 10b y tabla 7); decir que los valores de cenizas por organismo alimentando con *Phaeodactylum tricornutum* enriquecida con los mismos elementos, fueron superiores a los obtenidos con *Isochrysis galbana* var. T-iso. Dhont and Van Stappen, 2003 mencionan que diversos autores, citan en cultivos de *Artemia* adulta en condiciones de laboratorio porcentajes de cenizas en torno al 5 y 22% con diversos orígenes geográficos, así mismo Anh *et al.*, 2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes indican valores que oscilan entre 15 y 16%. En el presente estudio nuestros resultados se citan en torno al 5 y 8%.

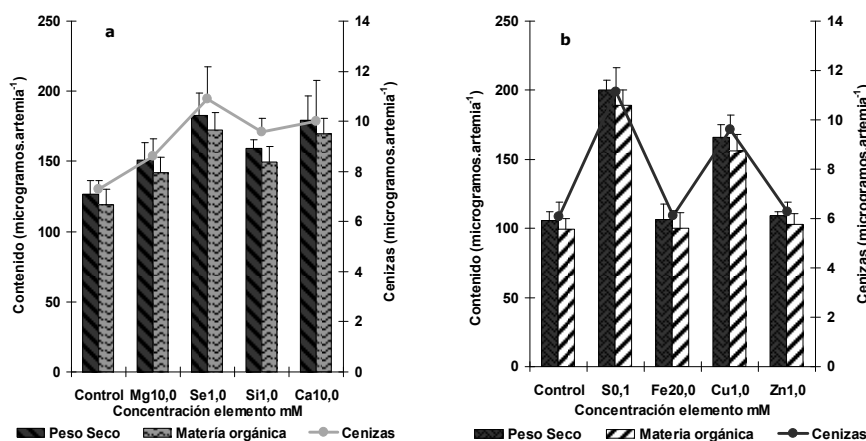


Figura 11.- Contenido organismo: peso seco, materia orgánica y cenizas ($\mu\text{g}.\text{Artemia}^{-1}$) respecto la concentración de elementos en *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo: **(a)** Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} **(b)** Fe^{3+} , Cu^{2+} , S^{2-} , Zn^{2+} . Media \pm SD ($n=3$).

La incorporación independiente de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} y Cu^{2+} por los adultos de *Artemia franciscana* vía *Isochrysis galbana* var. T-iso se puede observar en la figura 12 a-b y tablas 8-9; donde las cantidades de incorporación en *Artemia* en base al elemento fueron muy variables, lo que nos indica la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones ($p<0,05$), tablas 8-9. Tales diferencias concuerdan con la variabilidad de cenizas reportadas en todas las condiciones elementales, que además son evidentes en el comportamiento del peso seco y orgánico de *Artemia* vía el alimento. Reinfelder *et al.*, 1998, sugieren que la bioacumulación de un elemento se basa en modelos conceptuales sencillos en donde la concentración del elemento en el organismo esta controlada por el equilibrio entre el consumo, eliminación y crecimiento, tal y como ocurre en bivalvos, copépodos, rotíferos y *Artemia* (Wang and Fisher, 1998) y como vía de bioacumulación las microalgas (Lee and Luoma, 1998b). La eficiencia de asimilación en los hidrobiontes es directamente proporcional al contenido citoplasmático del elemento en las células microalgales que sirven de alimento en copépodos, larvas de bivalvos y gasterópodos

(Reinfelder and Fisher, 1991;1994; Hutchins *et al.*,1995; Wang and Fisher 1996; Chong and Wang 2000; Xu and Wang 2002; Cheung and Wang 2005). La eficacia de *Artemia* como un transportador de bioproductos de importancia dietética en niveles superiores de la cadena trófica es posible, por ejemplo productos liposolubles administrados a través de una emulsión, compuestos solubles en agua a través de liposomas (Hontoria *et al.*,1994; Tonheim *et al.*,2000; Monroig *et al.*, 2003, 2006; Nordgreen *et al.*,2007) portador de microcápsulas (Sakamoto *et al.*,1982; Medina-Reyna *et al.*,2002a, b, c; Medina-Reyna *et al.*,2005); y como demuestra el presente estudio el transporte y bioacumulación indirecta o directa de elementos minerales importantes en marcados procesos fisiológicos y limitatorios de deformaciones esqueléticas en estadios tempranos y postlarvales de diferentes especies marinas (Nguyen *et al.*,2008). El enriquecimiento vía la cadena trófica incluso modifica la composición de ácidos grasos y supervivencia de larvas de pargo; lo que sería una importante herramienta biotecnológica a fin de mejorar la calidad de la cría larvaria de peces marinos en laboratorio. La utilidad del método de bioencapsulation por *Artemia* queda comprobada por su análisis químico.

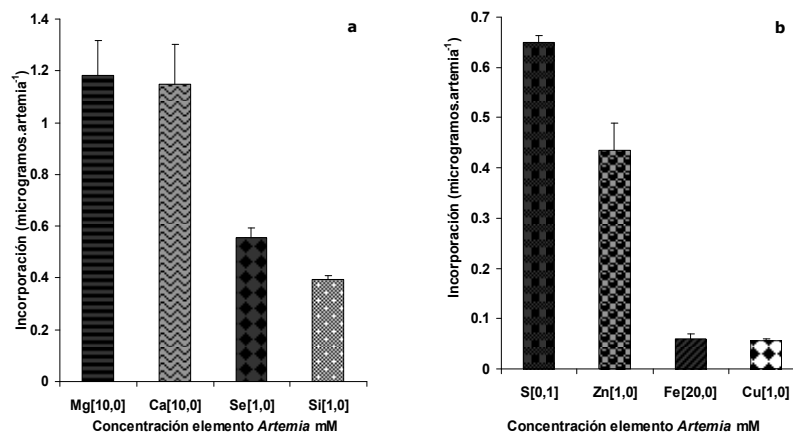


Figura 12.-Incorporación de elementos en *Artemia franciscana* alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso: **(a)** Mg²⁺, Ca²⁺, Si⁴⁺, Se²⁻ **(b)** S²⁻, Cu²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺. Media ± SD (n=3)

La inclusión de las concentraciones óptimas (capítulo 2) de magnesio, calcio, silicio, selenio, hierro, cobre, azufre y zinc con respecto a un control para la máxima generación de biomasa celular en *Isochrysis galbana* var. T-iso produjeron diferentes efectos como alimento en la composición bioquímica de *Artemia franciscana* de la siguiente manera: la biomasa celular con magnesio, calcio, silicio y selenio mostró la siguiente disposición bioquímica **Carbohidratos>Proteínas>Lípidos**(pg.cel⁻¹), en tanto que en *Artemia* una vez consumida la microalga la disposición fue **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos**(μg.Artemia⁻¹) en la mayoría de los casos (figura 13 a-b); en el caso de la biomasa celular con hierro, cobre, azufre y zinc reveló el siguiente orden en la composición proximal **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos**(pg.cel⁻¹), y una vez consumida la microalga por *Artemia* **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos**(μg.Artemia⁻¹) en la totalidad de los casos (figura 13 c-d). Como se puede observar la composición de *Artemia* no es necesariamente el reflejo de composición de la dieta.

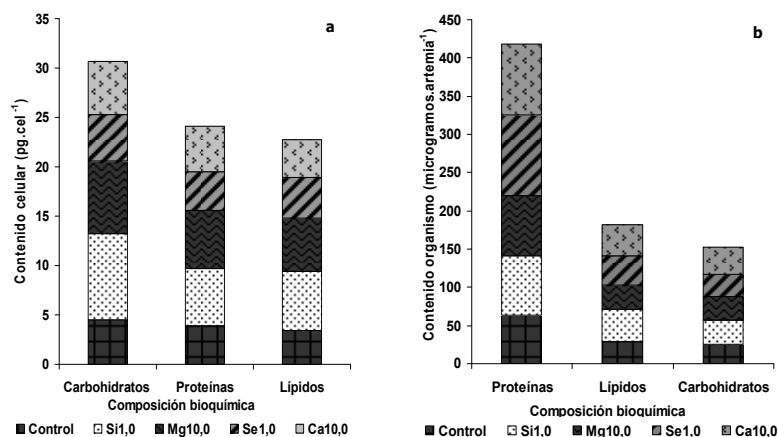


Figura 13.- Evolución de la composición bioquímica de *Isochrysis galbana* var. T-iso (pg.cel⁻¹) y de *Artemia franciscana* (μg.Artemia⁻¹) con respecto a Si⁴⁺, Mg²⁺, Se²⁻, Ca²⁺ (a,b).

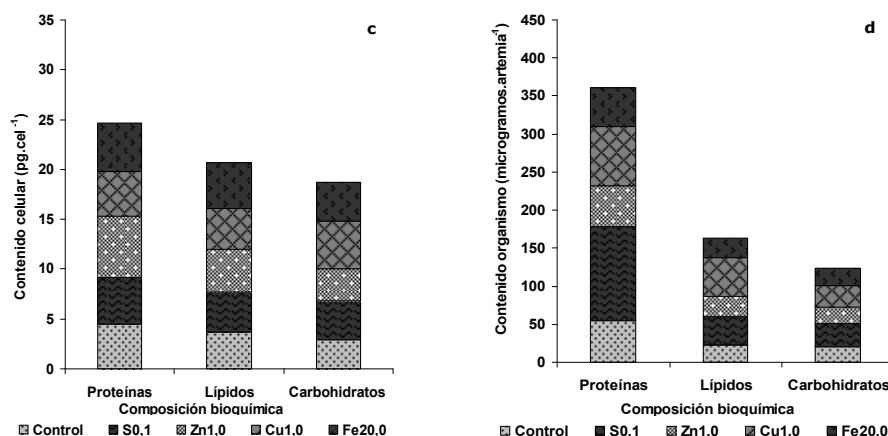


Figura 13.- Evolución de la composición bioquímica de *Isochrysis galbana* var Tiso (pg.cel⁻¹) y de *Artemia franciscana* (μg.Artemia⁻¹) con respecto a S²⁻, Cu²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺ (c,d).

En orden de importancia energética el contenido de proteína en *Artemia franciscana* fue el mayor combustible bioquímico (figura 13 b-d), una vez cultivada con la microalga y concentraciones conocidas de magnesio, calcio, silicio, selenio y control, mostrando los siguientes valores: 78,96, 92,77, 77,02, 105,48 y 63,84μg.Artemia⁻¹ comparativamente; existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$), ver tabla 6. Por lo que respecta al hierro, cobre, azufre, zinc y control se obtuvieron 51,66, 76,83, 122,59, 54,47 y 55,34μg.Artemia⁻¹ respectivamente; existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) (tabla 7). Indicar que dichos valores de proteína fueron inferiores a los obtenidos alimentando *Artemia* con *Phaeodactylum tricornutum* y el mismo enriquecimiento mineral (capítulo 3).

En tanto que el segundo combustible lo constituyó el contenido de lípidos (figura 13 b-d) que para el magnesio, calcio, silicio, selenio y control mostró 32,55, 41,09, 41,31, 37,50 y 29,55μg.Artemia⁻¹ (tabla 6), en tanto que para el hierro, cobre, azufre, zinc y control reveló valores de 26,31, 50,50, 36,82, 26,66 y 23,31μg.Artemia⁻¹ (tabla 7), indicando

diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre el hierro y el zinc. *Artemia* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* y el mismo enriquecimiento mineral (capítulo 3) mostró valores de contenido lipídico superiores a los valores aquí descritos.

Por lo que respecta a los carbohidratos (figura 13 b-d) valores de 30,72, 35,69, 31,09, 29,15 y 26,02 $\mu\text{g.Artemia}^{-1}$ estuvieron presentes en magnesio, calcio, silicio, selenio y control comparativamente (tabla 6) así como 22,44, 28,73, 29,54, 21,80 y 20,86 $\mu\text{g.Artemia}^{-1}$ en hierro, cobre, azufre, zinc y control; indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre el magnesio y el silicio (tabla 7). Dichos contenidos fueron muy semejantes a los obtenidos alimentando *Artemia* con *Phaeodactylum tricornutum* y el mismo enriquecimiento mineral (capítulo 3).

Cuando el contenido de proteína se considera como porcentaje de la fracción orgánica, tal valor fluctuó con relación al enriquecimiento elemental entre 51,45 y 64,88% figura 14 a-b y tablas 8-9; valores muy cercanos a los obtenidos en *Artemia* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* (54,12 y 70,70%) y el mismo enriquecimiento mineral (capítulo 3). Seixas *et al.*, 2009 en juveniles de 5 días alimentados con *Tetraselmis suecica* y *Rhodomonas lens* obtuvieron entre un 63 y 68% respectivamente en tanto que Anh *et al.*, 2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes describe entre un 55 y 56%. Los valores del presente estudio son similares a los descritos por Dhont and Van Stappen, 2003 para adultos de *Artemia* con un 39-67%. Los adultos de *Artemia* poseen una mayor cantidad de proteína que los nauplios debido a la dieta; así como un mayor contenido de los 10 principales aminoácidos esenciales que son considerados como necesarios por las larvas de peces.

Por lo que respecta a la fracción orgánica de los lípidos revelaron un rango de variación entre 19,48 y 32,36% figura 14 a-b y tablas 6-7. Zhukova *et al.*, 1998 indican que los porcentajes de asimilación de lípidos en *Artemia* responden a la variedad y calidad encontrada en la especie microalgal con que fue alimentada; en nuestro estudio tal calidad del alimento dependió de su enriquecimiento con diferentes elementos. Seixas *et al.*, 2009 alimentando juveniles por 5 días con *Rhodomonas lens* y *Tetraselmis suecica* demuestra un contenido entre 12 y 15%, Anh *et al.*, 2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes obtiene porcentajes en torno al 14%, en tanto que Dhont and Van Stappen, 2003 citan que varios autores han descrito porcentajes lipídicos en adultos en torno al 4 y 31%, valores muy cercanos al presente estudio.

Por otra parte Dhont and Van Stappen, 2003 respecto a carbohidratos obtienen entre un 4 y 20%, valores que nuestros resultados superan para esa fracción entre un 16,94 y 22,35% figura 14 a-b y tablas 6-7. Anh *et al.*, 2009 reporta porcentajes entre un 14 y 15%.

La fracción orgánica hace más evidente la compartimentalización de los combustibles bioquímicos en *Artemia franciscana* además de ser evidente que la calidad del alimento vía la diversidad de elementos promovió la calidad proximal de *Artemia*. Es sabido además que la ración alimenticia afecta la tasa reproductiva de *Artemia* y su contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos.

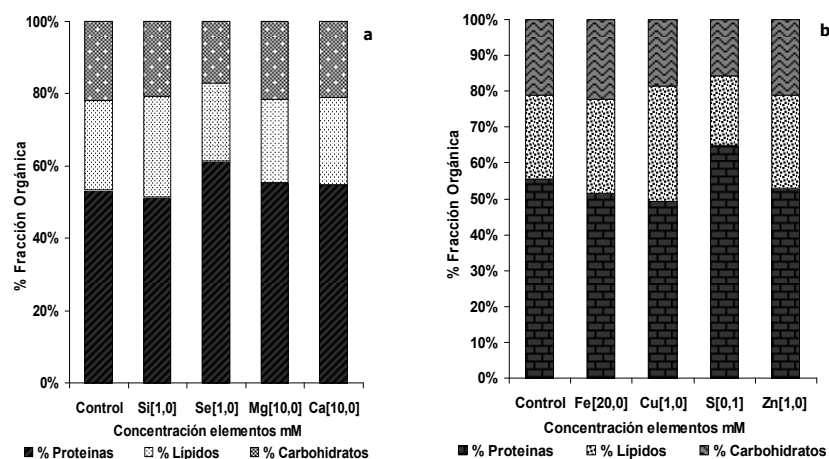


Figura 14.- Porcentaje de proteínas, lípidos y carbohidratos en *Artemia franciscana* respecto la concentración de elementos en *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo: **(a)** Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , **(b)** Fe^{3+} , S^{2-} , Cu^{2+} , Zn^{2+} .

En lo que concierne al valor calórico (VC) por *Artemia* en base a la calidad nutricional de *Isochrysis galbana* var. T-iso vía el magnesio, calcio, silicio, selenio y control mostró un rango de variación entre $3,14$ y $4,51 \times 10^{-6} J.Artemia^{-1}$ indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) (tabla 8); en tanto que vía el hierro, cobre, azufre, zinc y control manifestó una oscilación entre $2,60$ y $4,90 \times 10^{-6} J.Artemia^{-1}$ existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre el control y el hierro (tabla 9). Los valores aquí descritos de VC superan los referidos por Seixas *et al.*, 2009 en su estudio de alimentación con *Tetraselmis suecica* y *Rhodomonas lens* al T_5 con $1,16$ y $1,35 \times 10^{-6} J.Artemia^{-1}$; en tanto que *Artemia* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* con el mismo enriquecimiento mineral (capítulo 3) mostró valores en torno a $3,46-6,69 \times 10^{-6} J.Artemia^{-1}$ y $4,26-8,66 \times 10^{-6} J.Artemia^{-1}$ respectivamente. Lora-Vilchis *et al.*, 2004 indica que en preadultos de *Artemia* alimentados con *Isochrysis galbana* var. T-iso obtiene un VC de $11,8 \times 10^{-6} J.Artemia^{-1}$. Demostrando nuestros resultados que la calidad del alimento de *Artemia* vía el enriquecimiento mineral en la microalga demuestra diversos grados de calidad de *Artemia* en cultivo.

El contenido de ácidos grasos en *Artemia franciscana* fue modulado por la calidad de *Isochrysis galbana* var. T-iso (Zhukova *et al.*, 1998) enriquecida con diferentes concentraciones de elementos (capítulo 2); donde los ácidos grasos (AG) más abundantes entre un 5 y 33% están representados por el 14:0, 16:0, 16:1(n-7), 18:0, 18:1(n-9), 18:1(n-7) estimándose en conjunto en un 67,59-86,18% del total, resultados que superan los establecidos por Dhont and Van Stappen, 2003, con un 40-60%. Seixas *et al.*, 2009 mencionan que alimentando con diferentes microalgas el ácido graso saturado más abundante es el 16:0, sin embargo en el presente estudio el AG más abundante en *Artemia* fue el 18:1(n-9) entre un 24 y 33% reflejo de su abundancia en *Isochrysis galbana* var. T-iso (capítulo 2); Nelson *et al.*, 2004 enriqueciendo juveniles de *Artemia* de 5 días con *Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis galbana* obtiene valores de entre un 22-28%. Otros AG

poliinsaturados en conjunto de cadena corta entre un 8,59 y 19,99% son el 18:2(n-6), 18:3(n-3), 18:4(n-3) (Zhukova *et al.*,1998); en tanto ácidos grasos en conjunto con más de 20 carbonos representan un rango de entre 5,47 y 7,31%; siendo el 20:3(n-5), 20:4(n-6 AA), 20:5(n-3EPA) y 22:6(n-3DHA). Donde el AG AA fue posible detectarlo entre un 3,17 y 4,26%, en tanto que Seixas *et al.*,2009 alimentando con otras microalgas obtiene una concentración solo de 0,4%. Zhukova *et al.*,1998 indica que el metabolismo de los lípidos en *Artemia* es poco conocido ya que se ha observado la capacidad de este microcrustáceo para poder sintetizar mayores cantidades *de novo* de 16:0 y 18:0 que los encontrados en la dieta (capítulo 2), tal y como resultado evidente con el 18:0 en el presente estudio (tablas 10-11). Cada elemento en *Artemia franciscana* en la concentración ya descrita vía *Isochrysis galbana* var. T-iso, mostró diversos grados de evolución respecto a incrementar o decrecer porcentualmente tales AG.

En la presente disertación destaca por su importancia el ácido graso docosahexaenoico (22:6(n-3) DHA) que forma parte del equilibrio DHA/EPA en la normal pigmentación de larvas de peces planos entre otros procesos. DHA estuvo presente en los adultos de *Artemia* con los siguientes valores Mg^{2+} (0,48%), Ca^{2+} (0,58%), Si^{4+} (0,63%), Se^{2-} (0,54%), Control(0,44%) en tanto que con Fe^{3+} (0,67%), S^{2-} (0,82%), Zn^{2+} (1,07%), Cu^{2+} (0,74%), Control(0,51%) mostrándonos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$), tablas 10-11. Indicar que el contenido porcentual de DHA y EPA en la dieta microalgal enriquecida con los elementos y concentraciones ya descritas (capítulo 2); en la totalidad de los casos estuvo por encima de los valores porcentuales encontrados en *Artemia* una vez alimentada (tablas 10-11) con dicha dieta (DHA=4-12,60% EPA=0,43-0,80%) (tablas 12-19), mismo comportamiento describió Zhukova *et al.*,1998 inclusive indicando la desaparición del DHA en adultos de 2 semanas de edad; Olsen *et al.*, 1997 indican que después de 3 días de cultivo de juveniles de *Artemia* alimentados con *Isochrysis galbana* var. T-iso se observó una disminución en ellos, de entre un 84-92% de DHA, en tanto un 31-57% en EPA, tal disminución es debida a que este microcrustáceo posee una marcada propensión a retroconvertir ácidos grasos de cadena larga a corta (Evjemo *et al.*,1997; Navarro *et al.*, 1999) tanto en cantidad como en calidad, en función del tiempo de enriquecimiento o alimentación, lo que nos indicaría que los emplea en procesos de crecimiento y maduración sexual, que son indicativos de los valores ya descritos de TCA y %EC. La discusión anterior coincide con los valores de ARA encontrados en los adultos de *Artemia* los cuales estuvieron entorno al 1,54 y 4,26% (tablas 10-11) con respecto al 0,07 y 1,0% hallado en *Isochrysis galbana* var. T-iso enriquecida con los diferentes elementos (capítulo 2).

El contenido de AGT $\mu g.Artemia^{-1}$ que correspondió del contenido lipídico de *Artemia franciscana*, alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso enriquecida con cada elemento fue el siguiente: Mg^{2+} (37,94%), Ca^{2+} (24,73%), Si^{4+} (28,35%), Se^{2-} (25,49%), Control(28,02%) en tanto que con Fe^{3+} (21,25%), S^{2-} (10,92%), Zn^{2+} (17,67%), Cu^{2+} (19,78%), Control(16,21%); valores que estuvieron muy por debajo de los obtenidos en adultos de

Artemia alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* con el mismo enriquecimiento mineral (capítulo 3). Bell *et al.*, 2003 sugieren que existen dificultades en el apropiado enriquecimiento de *Artemia* con EPA y DHA lo que es un importante obstáculo para su idoneidad como presa viva en la alimentación de larvas de peces marinos. La pobre capacidad de enriquecimiento con EPA y DHA puede ser explicada por el alto contenido de lípidos libres antes y después del enriquecimiento especialmente triacilglicerol (3,9%), metil y ethylalkylketonas con pequeñas concentraciones de monoacilglicerol, diacilglicerol, esterol, ester de esterol, y en particular ácidos grasos libres de escaso valor nutritivo (Volkman *et al.*, 1981; Takeuchi *et al.*, 1992; McEvoy *et al.*, 1996; Zhukova *et al.*, 1998); que en el presente estudio dados los valores de DHA Y EPA fue posible corregir en baja escala mediante la calidad y riqueza de fosfolípidos por el alimento con *Isochrysis galbana* var. T-iso enriquecida con diferentes elementos (tabla 10-11). Es en base a nuestros resultados que observamos cuan importante y variable resulta ser la inclusión de diferentes elementos en la modificación del perfil bioquímico en la cadena trófica. Dhont and Van Stappen, 2003; McEvoy *et al.*, 1996 mencionan que los tiempos de enriquecimiento o crecimiento en *Artemia* influyen en calidad y cantidad de los lípidos presentes variando de un 23 a un 17% los fosfolípidos y de un 58 a un 64% los triacilglicerol, situación que nos explicaría la disminución del porcentaje de EPA y DHA en *Artemia* con respecto a la dieta.

Los peces marinos contienen grandes cantidades de ácido docosahexaenoico (22:6 n-3 DHA) eicosapentaenoico (20:5n-3 EPA) en los fosfolípidos de las membranas celulares. Los peces marinos no pueden biosintetizar DHA *de novo*, ni de los precursores de cadena más corta, como es el ácido alfa-linolénico (18:3 n-3). Por lo tanto, DHA y EPA serán componentes esenciales de la dieta en los peces marinos. El DHA está presente en concentraciones muy elevadas en las membranas de células neuronales y visuales, particularmente en las membranas celulares externas así como membranas sinaptosomales, en peces como en mamíferos (Sargent *et al.*, 1997, 1999).

Por lo tanto, una insuficiencia de DHA en la dieta en etapas larvales tempranas de peces marinos es que puede perjudicar el desarrollo neurológico y visual con graves consecuencias para una serie de procesos fisiológicos y de comportamiento incluyendo los que dependen neuroendocrinológicamente.

Pigmentación anormal es común en los cultivos de larvas de peces planos marinos, y se puede mejorar sustancialmente rectificando el nivel de DHA en las larvas mediante el alimento vivo (Kanazawa *et al.*, 1981; Kanazawa, 1993; Reitan *et al.*, 1994b; McEvoy *et al.*, 1998b). Se ha considerado que la mal pigmentación puede ser consecuencia de un mal funcionamiento neuronal o visual, por ejemplo, de procesamiento anormal de las señales visuales, ya sea en el propio ojo, o posteriormente en el cerebro, desde la producción anormal de la hormona estimulante de melanocitos en el cerebro, de frente a perturbaciones en las conexiones sinápticas entre los nervios y el melanóforo en la piel. El síndrome de mal pigmentación es causado por una deficiencia de DHA o un exceso de EPA, por lo que diversos autores han documentado la importancia de una alta razón DHA:EPA (Kraul, 1993; Mourente *et al.*, 1993; Reitan *et al.*, 1994b; Lavens *et al.*, 1995).

La proporción porcentual de los AG **DHA/EPA** en los adultos de *Artemia* estudiados en base al enriquecimiento mineral en *Isochrysis galbana* var. T-iso se encontró entre 0,67:1% y 2,07:1% (tabla 10-11), donde adultos enriquecidos con zinc, y con selenio cumplen con los requerimientos reportados por Reitan *et al.*, 1994b en Sargent *et al.*, 1999 donde logra eliminar la mal pigmentación de larvas de rodaballo incluyendo aceite refinado de atún rico en DHA en proporción **DHA/EPA** 2:1%. Es de destacar que esta es esencialmente la misma proporción de DHA/EPA que existe en la yema de los muchos huevos y larvas de peces marinos (Tocher and Sargent, 1984). Aun cuando la mayoría de nuestros resultados (tablas 10-11) con excepción de adultos enriquecidos con zinc y con selenio, estuvieron por debajo de la proporción DHA:EPA 2:1%, es de destacar que fueron \geq a los valores descritos por Ando *et al.*, 2004 enriqueciendo metanauplios de *Artemia* con aceites de pescado ricos en ácidos grasos ethyl ester en torno al 1,4:1%.

Se observaron importantes diferencias con respecto a los diferentes elementos en la evolución porcentual y $\mu\text{g.Artemia}^{-1}$ de los ácidos grasos saturados (AGS entre un 29,56 y 43,88%) mas los monoinsaturados (AGM oscilando entre 35,84 y 46,62%) con respecto a los poliinsaturados (AGP fluctuando entre 12,89 y 24,87%), indicándonos la existencia en ambos grupos (AGS+AGM y AGP), de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto al control ($p<0,05$), figura 15 a-b y tablas 10-11. Seixas *et al.*, 2009 alimentando juveniles de *Artemia* con diferentes microalgas demuestra valores de 35-38% para AGS, en tanto que en AGM un 27-28% y en AGP un 35%. Por lo que respecta a la presente disertación en adultos de *Artemia* alimentados con *Phaeodactylum tricornutum* con diferente enriquecimiento mineral (capítulo 3) se indicaron valores de entre 18,72 y 51,15% para AGS, así como 38,12 y 70,74% para AGM, y 9,11 y 14,13% para AGP.

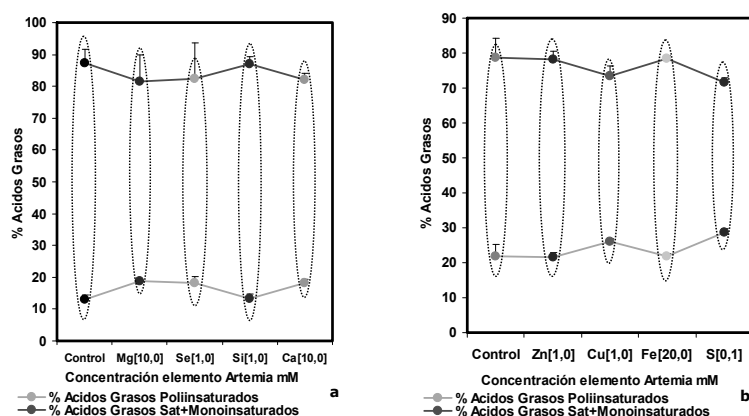


Figura 15.- Evolución porcentual del contenido de ácidos grasos en *Artemia franciscana* alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo con: (a) Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Ca^{2+} (b) Zn^{2+} , S^{2-} , Cu^{2+} , Fe^{3+} . Media \pm SD ($n=3$)

Los ácidos grasos poliinsaturados poseen tres grandes familias, mediante las cuales se derivan los procesos de elongación a ácidos grasos de cadena larga como son la **serie ω -9, ω -6 y ω -3**; de los cuales las series importantes son la ω -3 y ω -6, así mismo la proporción entre estas dos series es de relevante importancia en el valor energético en cada uno de los

niveles tróficos, aspecto que se ha descuidado en la nutrición de organismos marinos (Estévez *et al.*, 1999), por lo que una mayor proporción de los ω -3 en la cadena trófica es imprescindible en efectivos mecanismos formadores de membrana durante la metamorfosis de organismos marinos (Reitan *et al.*, 1994; Estévez and Kanazawa, 1995). Es así que las proporciones de ácidos grasos ω -3: ω -6 después del enriquecimiento en *Artemia franciscana* mostraron diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación con respecto al control ($p<0,05$) ver *tablas 10 y 11*. La proporción porcentual de los AG ω -3: ω -6 en los elementos estudiados se encontró entre 1,23:1 y 2,92:1 (*tabla 10-11*). Dicha proporción en adultos de *Artemia* alimentados con *Phaeodactylum tricornutum* enriquecida con diferentes elementos (capítulo 3) mostró superiores proporciones en el orden de 1,89:1 y 8,49:1.

Actualmente, se esta prestado bastante atención a las investigaciones sobre la composición bioquímica y mineral de alimentos vivos, utilizados en la acuicultura, ya que el cultivo exitoso de peces y numerosos invertebrados acuáticos depende en parte de la correspondencia de la calidad nutricional de la dieta con las necesidades nutricionales de los organismos cultivados. Entre las diversas especies de zooplancton, el microcrustáceo *Artemia franciscana* es necesariamente utilizado como el tercer eslabón alimenticio vivo en la cría de estadios tempranos de crustáceos y larvas de varios peces marinos y de agua dulce. El conocimiento de las peculiaridades y los rangos de variación de la composición bioquímica de los organismos utilizados como alimento vivo vía la nutrición mineral es necesaria, a fin de elegir el método más apropiado para incrementar el valor nutritivo de los organismos cultivados. Una de las características bioquímicas más importantes a la que más atención se da en la elección de un alimento apropiado es la composición de ácidos grasos de los lípidos.

Tabla 1

Cultivo del Rotífero *Brachionus plicatilis* alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso (cultivo semicontinuo) y elementos óptimos (modificado de Fábregas *et al.*, 1984). Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹

	Control	Silicio1,0mM	Selenio1,0mM	Calcio10,0mM	Magnesio10,0mM
Densidad celular (10⁶ cél.mL⁻¹ std)	82,60 ±4,92	91,70 ±7,69	106,57 ±8,28	102,20 ±6,37	82,95 ±6,18
Productividad (10⁹ céls.L⁻¹.día⁻¹)	24,78 ±1,37	27,51 ±2,62	31,97 ±3,34	30,66 ±2,92	24,88 ±2,42
F.O. celular					
%proteína en F.O.	28,91	26,62	26,99	31,79	29,07
% carboh. en F.O.	44,44	49,81	46,67	44,23	46,41
% lípidos en F.O.	26,64	23,57	26,33	23,97	24,51
F.O. Rotífero					
%proteína en F.O.	70,78	68,55	65,87	69,22	67,37
% carboh. en F.O.	11,74	12,66	13,92	12,43	13,24
% lípidos en F.O.	17,48	18,78	20,20	18,34	19,38
Proteínas (pg.célula⁻¹ ± std)	2,88 ±1,79	3,06 ±2,59	3,02 ±2,82	3,53 ±2,73	3,60 ±2,32
Carbohidratos (pg.célula⁻¹ ± std)	4,43 ±0,14	5,73 ±0,43	5,22 ±0,48	4,91 ±0,16	5,74 ±0,60
Lípidos (pg.célula⁻¹ ± std)	2,66 ±0,24	2,71 ±0,12	2,95 ±0,34	2,66 ±0,12	3,03 ±0,13
P. orgánico (pg.cel⁻¹)	9,97	11,50	11,19	11,11	12,37
Proteínas (ng.rotífero⁻¹ ±std)	170,95a ±15,20	173,12b ±12,41	195,86e ±13,72	193,42d ±16,15	191,01c ±17,70
Carbohidratos (ng.rotífero⁻¹ ±std)	28,35a ±1,94	31,98ab ±1,42	41,40d ±1,71	34,73bc ±1,09	37,55cd ±1,12
Lípidos (ng.rotífero⁻¹ ±std)	42,22a ±1,79	47,44ab ±2,04	60,07d ±2,73	51,24bc ±3,79	54,96cd ±1,60
P. orgánico (ng.rotífero⁻¹)	241,52	252,54	297,33	279,39	283,52
Valor calórico (10⁻⁷ J.célula⁻¹)	2,49	2,78	2,78	2,73	3,03
Valor calórico (10⁻⁷ J.rotífero⁻¹)	62,49a	65,70b	77,75d	72,53c	73,91c
Peso seco (µg.mL⁻¹ ±std)	1591,53 ±33,80	1868,47 ±184,10	1960,53 ±146,89	1476,33 ±22,60	1510,33 ±42,63
Peso seco (pg.cel⁻¹ ±std)	11,94 ±1,14	14,07 ±1,07	13,94 ±1,58	14,37 ±1,37	15,70 ±1,81
Peso seco (ng.rotífero⁻¹ ±std)	249,68a ±15,67	261,58b ±16,88	308,18e ±22,05	289,75c ±10,99	294,12d ±25,34
Cenizas (pg.cel⁻¹ ±std)	1,97 ±0,15	2,57 ±0,16	2,74 ±0,18	3,20 ±0,27	3,33 ±0,28
Cenizas (ng.rotífero⁻¹ ±std)	8,16a ±0,30	9,04b ±0,57	10,85d ±1,81	10,36c ±1,15	10,60d ±1,33
Materia Orgánica (pg.cel⁻¹ ±std)	9,97 ±0,70	11,50 ±1,18	11,19 ±2,07	11,07 ±1,13	12,37 ±1,54
Materia Orgánica (ng.rotífero⁻¹ ±std)	240,32a ±15,88	251,54b ±17,58	297,33e ±15,28	279,75c ±17,74	282,52d ±26,79
DensidadT₈ (rotíferos.mL⁻¹ ± std)	246,00a ±28,51	314,00d ±26,00	294,00b ±25,93	325,00e ±12,29	302,00c ±35,00
DensidadT₈ (huevos.mL⁻¹ ± std)	46,00a ±6,18	60,00c ±8,18	56,00b ±6,54	73,33d ±3,58	83,00e ±3,87
Q_N celular (pg)	5,38 ±0,12	6,02 ±0,08	7,05 ±0,08	5,60 ±0,04	6,72 ±0,16
Q_C celular (pg)	62,68 ±0,41	61,82 ±1,54	84,78 ±2,40	63,72 ±0,60	74,23 ±0,79
RelaciónC:N(átomos)	9,99	8,80	10,31	9,76	9,46

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 2
Cultivo del Rotífero *Brachionus plicatilis* alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso (cultivo semicontinuo) y elementos óptimos (modificado de Fábregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹

	Control	Azufre0,1mM	Zinc1,0mM	Cobre1,0mM	Hierro20,0mM
Densidad celular (10⁶ cél.mL⁻¹ std)	65,10 ±4,28	78,30 ±7,26	71,25 ±6,28	74,40 ±5,39	76,05 ±7,28
Productividad (10⁹ céls.L⁻¹.día⁻¹)	19,53 ±1,38	23,49 ±2,18	21,37 ±1,92	22,32 ±2,09	22,81 ±
F.O. celular					
%proteína en F.O.	14,35	19,37	17,54	17,40	19,19
% carboh. en F.O.	47,20	43,95	45,48	42,73	48,10
% lípidos en F.O.	38,44	36,68	36,98	39,86	32,70
F.O. Rotífero					
%proteína en F.O.	67,80	72,03	67,01	71,17	66,30
% carboh. en F.O.	11,92	11,12	12,91	11,26	13,16
% lípidos en F.O.	20,27	16,84	20,08	17,56	20,54
Proteínas (pg.célula⁻¹ ± std)	5,24 ±0,20	6,40 ±0,71	6,34 ±0,28	5,79 ±0,35	5,85 ±0,49
Carbohidratos (pg.célula⁻¹ ± std)	2,91 ±0,19	3,89 ±0,32	3,28 ±0,30	4,70 ±0,18	3,99 ±0,17
Lípidos (pg.célula⁻¹ ± std)	3,67 ±0,35	3,76 ±0,10	4,42 ±0,11	4,46 ±0,14	3,80 ±0,27
P. orgánico (pg.cel⁻¹)	11,82	14,05	14,04	14,95	13,64
Proteínas (ng.rotífero⁻¹ ±std)	168,91a ±12,52	260,14c ±20,31	170,07a ±2,14	255,55b ±17,00	168,29a ±0,88
Carbohidratos (ng.rotífero⁻¹ ±std)	29,70a ±1,44	40,17bc ±2,72	32,76a ±3,70	40,44c ±2,36	33,41ab ±2,98
Lípidos (ng.rotífero⁻¹ ±std)	50,49a ±2,76	60,81c ±4,21	50,97ab ±2,81	63,06d ±1,31	52,13b ±1,60
Peso orgánico (ng.rotífero⁻¹)	249,10	361,12	253,80	359,05	253,83
Valor calórico (10⁻⁷ J.célula⁻¹)	2,27	2,63	2,81	3,03	2,72
Valor calórico (10⁻⁷ J.rotífero⁻¹)	65,52a	93,23c	66,49b	93,06c	66,65b
Peso seco (µg.mL⁻¹ ±std)	1487,80 ±13,20	1454,07 ±44,31	1529,67 ±52,50	1494,27 ±112,26	1534,87 ±29,07
Peso seco (pg.cel⁻¹ ±std)	13,95 ±2,27	17,14 ±1,99	17,38 ±1,16	18,66 ±1,47	17,29 ±1,59
Peso seco (ng.rotífero⁻¹ ±std)	257,87a ±26,62	374,05b ±11,51	262,63ab ±21,66	372,05ab ±15,74	262,78ab ±13,01
Cenizas (pg.cel⁻¹ ±std)	2,13 ±0,21	3,09 ±0,31	3,33 ±0,41	3,71 ±0,43	3,66 ±0,37
Cenizas (ng.rotífero⁻¹ ±std)	8,77a ±0,5	12,93ab ±1,50	8,83ab ±0,18	12,99b ±1,24	8,91ab ±0,85
Materia Orgánica (pg.cel⁻¹ ±std)	11,80 ±0,97	14,05 ±1,23	14,02 ±1,30	14,95 ±1,66	13,64 ±1,67
Materia Orgánica (ng.rotífero⁻¹ ±std)	249,09a ±19,02	360,05b ±12,17	253,80ab ±13,38	359,05ab ±13,53	253,83ab ±12,10
DensidadT₈ (Rotíferos.mL⁻¹ ± std)	226,0a ±27,58	263,0c ±17,01	255,0b ±22,60	303,0e ±10,39	293,0d ±25,24
DensidadT₈ (huevos.mL⁻¹)	50,0a ±6,11	78,0c ±8,08	79,0c ±6,02	96,0d ±9,39	56,0b ±8,50
Q_N celular (pg)	7,10 ±0,07	7,63 ±0,35	7,49 ±0,21	7,14 ±0,02	8,59 ±0,16
Q_C celular (pg)	72,25 ±0,90	79,47 ±1,68	76,24 ±0,73	70,68 ±0,47	86,81 ±1,08
RelaciónC:N(átomos)	8,72	8,92	8,73	8,49	8,66

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

<div> <div>Tabla 3</div> <div>Absorción atómica de elementos en <i>Brachionus plicatilis</i> alimentado con <i>Isochrysis galbana</i> var. T-iso (cultivo semicontinuo) y elementos en concentraciones óptimas (modificado de Fábregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%/día⁻¹</div> </div>				
Absorción Atómica	Rotífero sin Adición elemento	Absorción Atómica	Rotífero con Adición elemento	
Ca[0]mM (ng.rotífero ⁻¹)	0,81a ±0,03	Ca[10,0]mM (ng.rotífero ⁻¹)		2,78b ±0,14
Ca[0]mM (pg.cél ⁻¹)	0,16 ±0,01	Ca[1,0]mM (pg.cél ⁻¹)		0,24 ±0,03
Mg[0]mM (ng.rotífero ⁻¹)	0,81a ±0,01	Mg[10,0]mM (ng.rotífero ⁻¹)		1,85b ±0,18
Mg[0]mM (pg.cél ⁻¹)	0,41 ±0,03	Mg[10,0]mM (pg.cél ⁻¹)		0,64 ±0,07
Se[0]mM (pg.rotífero ⁻¹)	1,4a ±0,2	Se[1,0]mM (pg.rotífero ⁻¹)		18,0b ±1,20
Se[0]mM (fg.cél ⁻¹)	0,30 ±	Se[1,0]mM (fg.cél ⁻¹)		0,63 ±0,05
Si[0]mM (pg.rotífero ⁻¹)	11,0a ±0,098	Si[1,0]mM (pg.rotífero ⁻¹)		30,0b ±2,0
Si[0]mM (fg.cél ⁻¹)	0,71 ±0,02	Si[1,0]mM (fg.cél ⁻¹)		1,9 ±0,13
Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0,05).				

Tabla 4

Absorción atómica de elementos en *Brachionus plicatilis* alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso (cultivo semicontinuo) y elementos en concentraciones óptimas (modificado de Fábregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%/día⁻¹

Absorción Atómica	Rotíferos sin Adición elemento	Absorción Atómica	Rotíferos con Adición elemento
Zn[0]mM (ng.rotífero ⁻¹)	0,20a ±0,02	Zn[1,0]mM (ng.rotífero ⁻¹)	0,26b ±0,02
Zn[0]mM (fg.cél ⁻¹)	2,0 ±0,13	Zn[1,0]mM (fg.cél ⁻¹)	2,96 ±0,15
S[0]mM (ng.rotífero ⁻¹)	1,17a ±0,17	S[0,1]mM (ng.rotífero ⁻¹)	2,19b ±0,24
S[0]mM (pg.cél ⁻¹)	0,16 ±0,015	S[0,1]mM (pg.cél ⁻¹)	0,20 ±0,013
Cu[0]mM (pg.rotífero ⁻¹)	8,2a ±0,32	Cu[1,0]mM (pg.rotífero ⁻¹)	12,4b ±0,87
Cu[0]mM (fg.cél ⁻¹)	0,092 ±0,005	Cu[1,0]mM (fg.cél ⁻¹)	0,11 ±0,01
Fe[0]mM (ng.rotífero ⁻¹)	0,15a ±0,010	Fe[20,0]mM (ng.rotífero ⁻¹)	0,85b ±0,015
Fe[0]mM (fg.cél ⁻¹)	0,79 ±0,03	Fe[20,0]mM (fg.cél ⁻¹)	6,0 ±0,20

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0,05).

Tabla 5. Composición de Ácidos Grasos *Brachionus plicatilis* (% del total A.G.), ácidos grasos x rotífero (A.G. ng.rotífero⁻¹) y lípidos totales x rotífero (ng.rotífero⁻¹) alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes concentraciones [mM] de elementos.

	(Control)				[Mg10,0]				[Se1,0]				[Ca10,0]				[Si1,0]			
	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹		
Acido Graso																				
12:0	1.31±0.16	0.20±0.01	0.60±0.01	0.10±0.02	0.55±0.04	0.10±0.01	0.48±0.02	0.08±0.00	1.61±0.30	0.28±0.02										
14:0	19.48±0.87	2.94±0.16	14.70±1.18	2.46±0.21	16.52±0.64	3.04±0.06	17.21±1.84	2.98±0.36	17.84±0.16	3.10±0.27										
15:0	1.59±0.14	0.24±0.03	1.23±0.07	0.12±0.01	1.19±0.09	0.22±0.03	1.22±0.12	0.21±0.02	1.22±0.12	0.21±0.02										
16:0	26.24±2.20	3.96±0.36	19.24±1.27	3.22±0.20	20.24±1.09	3.72±0.01	20.30±0.42	3.51±0.12	22.04±1.45	3.82±0.13										
16:1(n-7)	8.27±0.41	1.25±0.12	6.63±0.30	1.11±0.05	6.86±0.18	1.27±0.10	5.82±0.25	1.00±0.03	6.60±0.76	1.16±0.12										
16:2(n-6)	0.57±0.02	0.09±0.00	0.74±0.01	0.12±0.02	0.72±0.08	0.13±0.02	0.61±0.04	0.11±0.01	0.57±0.01	0.10±0.01										
16:2(n-4)	0.43±0.05	0.06±0.01	0.52±0.01	0.09±0.02	0.53±0.01	0.10±0.03	0.39±0.02	0.07±0.00	0.42±0.01	0.07±0.01										
18:0	4.60±0.50	0.69±0.07	9.01±0.56	1.51±0.16	5.23±0.55	0.96±0.04	5.16±0.38	0.89±0.01	7.51±0.32	1.31±0.18										
18:1(n-9)	19.83±1.96	2.99±0.24	21.11±2.14	3.54±0.35	19.91±0.58	3.67±0.31	22.52±1.89	3.89±0.21	18.56±0.59	3.24±0.41										
18:1(n-7)	0.94±0.03	0.14±0.01	1.72±0.13	0.29±0.03	1.57±0.06	0.29±0.03	1.77±0.16	0.30±0.01	1.15±0.10	0.20±0.00										
18:2(n-6)	4.70±0.31	0.71±0.04	5.90±0.25	0.99±0.02	5.74±0.41	1.06±0.13	3.04±0.36	0.54±0.04	4.38±0.21	0.76±0.01										
18:3(n-6)	0.12±0.01	0.02±0.00	0.15±0.01	0.02±0.00	0.14±0.02	0.03±0.00	0.12±0.01	0.02±0.00	0.14±0.01	0.02±0.00										
18:3(n-3)	2.10±0.20	0.32±0.02	3.72±0.28	0.62±0.01	3.09±0.29	0.57±0.06	3.10±0.27	0.53±0.03	2.59±0.01	0.45±0.04										
18:4(n-3)	2.88±0.12	0.43±0.01	4.29±0.24	0.72±0.02	3.83±0.12	0.71±0.06	3.88±0.18	0.67±0.01	3.29±0.18	0.57±0.06										
20:0	0.02±0.00	0.00±0.00	0.17±0.02	0.03±0.00	0.13±0.02	0.02±0.00	0.71±0.01	0.12±0.01	0.12±0.01	0.02±0.00										
20:1(n-9)	0.73±0.05	0.11±0.01	2.56±0.15	0.43±0.02	2.27±0.23	0.42±0.06	0.79±0.08	0.14±0.01	1.49±0.07	0.26±0.03										
20:2(n-9)	0.06±0.00	0.01±0.00	0.12±0.01	0.02±0.00	0.11±0.01	0.02±0.00	0.09±0.01	0.02±0.00	0.09±0.00	0.02±0.00										
20:3(n-5)	0.22±0.02	0.03±0.01	0.52±0.01	0.09±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.53±0.04	0.09±0.01	0.37±0.04	0.07±0.00										
20:4(n-6)	2.01±0.09	0.30±0.01	4.26±0.43	0.71±0.03	4.15±0.12	0.77±0.06	3.79±0.34	0.65±0.07	3.02±0.15	0.53±0.06										
20:4(n-3)	0.73±0.23	0.11±0.01	1.49±0.14	0.25±0.02	1.35±0.12	0.25±0.04	1.44±0.09	0.25±0.01	1.20±0.04	0.21±0.03										
20:5(n-3)	0.28±0.02	0.04±0.00	0.51±0.02	0.08±0.00	0.50±0.01	0.09±0.01	0.53±0.03	0.09±0.00	0.40±0.04	0.07±0.01										
22:0	0.06±0.01	0.01±0.00	0.15±0.02	0.03±0.00	0.04±0.00	0.01±0.00	0.26±0.02	0.04±0.00	0.08±0.01	0.01±0.00										
22:1	0.18±0.01	0.03±0.00	0.22±0.02	0.04±0.00	0.25±0.02	0.05±0.00	0.23±0.03	0.04±0.00	0.20±0.00	0.04±0.00										
22:5(n-3)	0.42±0.06	0.06±0.01	0.80±0.03	0.13±0.01	0.68±0.01	0.13±0.01	0.81±0.03	0.14±0.01	0.66±0.03	0.12±0.01										
22:6(n-3)	1.54±0.13	0.23±0.02	5.66±0.63	0.95±0.01	4.40±0.17	0.81±0.01	5.20±0.05	0.90±0.04	4.43±0.04	0.77±0.08										
Saturados	53.31±4.59	8.05±0.77	45.09±3.78	7.56±0.58	43.88±2.19	8.07±0.06	45.34±0.80	7.84±0.38	50.42±1.77	8.75±0.55										
Monoinsaturados	29.95±1.3e	4.52±0.15	32.25±2.6c	5.41±0.38	30.87±1.1a	5.70±0.51	31.13±2.3b	5.37±0.22	28.01±1.3d	4.89±0.46										
Poliinsaturados	16.74±1.3a	2.52±0.15	27.74±2.3e	4.65±0.25	25.25±1.1d	4.66±0.46	23.53±1.6c	4.07±0.39	21.57±0.4b	3.76±0.43										
ω-3	7.04±0.10	1.07±0.10	12.46±1.45	2.09±0.26	13.17±0.36	2.43±0.20	14.15±0.50	2.44±0.01	11.92±0.17	2.07±0.23										
ω-6	6.72±0.35	1.02±0.09	9.48±0.06	1.59±0.02	10.76±0.62	1.99±0.22	7.56±0.17	1.31±0.14	8.11±0.26	1.41±0.18										
ω-3/ ω-6	1.04±0.1a	1.04±0.09	1.31±0.1c	1.31±0.11	1.23±0.0b	1.23±0.04	1.87±0.1e	1.87±0.17	1.47±0.0d	1.47±0.03										
DHA	1.54±0.1a	0.23±0.02	5.66±0.6e	0.95±0.01	4.40±0.2b	0.81±0.01	5.20±0.1d	0.90±0.04	4.43±0.1c	0.77±0.08										
EPA	0.28±0.02	0.04±0.00	0.51±0.02	0.08±0.00	0.50±0.01	0.09±0.01	0.53±0.03	0.09±0.00	0.40±0.03	0.07±0.01										
DHA/EPA	5.50±0.4a	5.50±0.38	11.10±1.2d	11.10±1.16	8.80±0.3b	8.80±0.35	9.81±0.6c	9.81±0.57	11.21±1.2e	11.21±1.17										
EPA/DHA	0.18±0.02	0.18±0.02	0.09±0.01	0.09±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01	0.10±0.01	0.10±0.01	0.09±0.02	0.09±0.02										
DHA/ARA	0.77±0.0a		1.33±0.1c	1.06±0.1b			1.37±0.1d		1.47±0.1e											
Total A.G.	±	15.09±0.2a	±	17.62±1.5c	±	18.43±1.0d	±	17.28±0.5b	±	17.39±1.7c										
Total Lípidos	±	42.22±1.79	±	54.96±1.60	±	60.07±2.73	±	51.24±3.79	±	47.44±2.04										

A.G. acido graso, DHA, docosahexaenoico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0.05).

A.G. ácido graso, DHA, docosahexaenoico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0.05).

Tabla 6. Composición de Ácidos Grasos *Brachionus plicatilis* (% del total A.G.), ácidos grasos x rotífero (A.G. ng.rotífero⁻¹) y lípidos totales x rotífero (ng.rotífero⁻¹) alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes concentraciones [mM] de elementos.

Acido Graso	(Control)			[Cu1,0]			[Fe20,0]			[S0,1]			[Zn1,0]		
	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	ng.rotífero ⁻¹
12:0	0.65±0.05	0.09±0.00	0.42±0.01	0.39±0.04	0.08±0.00	0.39±0.04	0.39±0.04	0.05±0.00	0.49±0.01	0.09±0.00	0.40±0.02	0.40±0.02	0.09±0.03	0.09±0.03	0.09±0.03
14:0	17.54±1.86	2.43±0.17	13.63±1.36	5.51±0.21	2.44±0.37	5.51±0.21	5.51±0.21	0.79±0.03	15.93±1.05	2.91±0.09	15.25±0.54	15.25±0.54	3.42±0.27	3.42±0.27	3.42±0.27
15:0	1.64±0.15	0.22±0.07	1.20±0.08	1.15±0.16	0.22±0.06	1.15±0.16	1.15±0.16	0.16±0.02	1.33±0.09	0.24±0.01	1.25±0.07	1.25±0.07	0.28±0.01	0.28±0.01	0.28±0.01
16:0	24.76±1.96	3.42±0.18	16.79±0.93	23.61±1.00	3.01±0.45	23.61±1.00	23.61±1.00	3.20±0.01	19.49±0.96	3.57±0.21	19.16±0.85	19.16±0.85	4.28±0.08	4.28±0.08	4.28±0.08
16:1(n-7)	6.81±0.11	0.94±0.08	6.01±0.44	6.04±0.61	1.09±0.08	6.04±0.61	6.04±0.61	0.82±0.05	6.19±0.09	1.13±0.08	6.24±0.48	6.24±0.48	1.40±0.08	1.40±0.08	1.40±0.08
16:2(n-6)	0.51±0.01	0.07±0.00	0.77±0.07	0.62±0.09	0.14±0.03	0.62±0.09	0.62±0.09	0.08±0.01	0.64±0.06	0.12±0.02	0.58±0.05	0.58±0.05	0.13±0.01	0.13±0.01	0.13±0.01
16:2(n-4)	0.31±0.01	0.04±0.00	0.51±0.01	0.42±0.03	0.09±0.00	0.42±0.03	0.42±0.03	0.06±0.01	0.38±0.04	0.07±0.00	0.41±0.01	0.41±0.01	0.09±0.00	0.09±0.00	0.09±0.00
18:0	7.25±0.59	0.99±0.04	6.55±0.11	6.14±0.66	1.21±0.12	6.14±0.66	6.14±0.66	0.83±0.05	6.21±0.60	1.14±0.12	7.28±0.38	7.28±0.38	1.62±0.14	1.62±0.14	1.62±0.14
18:1(n-9)	20.00±1.96	2.76±0.25	21.96±0.73	22.22±2.11	3.98±0.28	22.22±2.11	22.22±2.11	3.01±0.16	21.75±0.26	3.98±0.27	21.80±0.75	21.80±0.75	4.89±0.41	4.89±0.41	4.89±0.41
18:1(n-7)	1.41±0.12	0.19±0.03	1.56±0.12	1.26±0.15	0.29±0.03	1.26±0.15	1.26±0.15	0.17±0.01	1.51±0.04	0.28±0.03	1.35±0.20	1.35±0.20	0.30±0.03	0.30±0.03	0.30±0.03
18:2(n-6)	3.60±0.26	0.50±0.01	5.76±0.57	5.85±0.64	1.05±0.10	5.85±0.64	5.85±0.64	0.79±0.05	4.91±0.35	0.90±0.01	4.98±0.47	4.98±0.47	1.12±0.15	1.12±0.15	1.12±0.15
18:3(n-6)	0.12±0.01	0.02±0.00	0.15±0.01	0.14±0.03	0.03±0.00	0.14±0.03	0.14±0.03	0.02±0.00	0.13±0.02	0.02±0.00	0.12±0.01	0.12±0.01	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00
18:3(n-3)	2.33±0.37	0.32±0.05	3.78±0.37	3.52±0.35	0.69±0.02	3.52±0.35	3.52±0.35	0.48±0.03	3.06±0.15	0.56±0.07	2.95±0.39	2.95±0.39	0.67±0.02	0.67±0.02	0.67±0.02
18:4(n-3)	2.37±0.15	0.33±0.03	4.73±0.28	4.02±0.61	0.86±0.02	4.02±0.61	4.02±0.61	0.54±0.06	3.60±0.39	0.66±0.01	3.95±0.35	3.95±0.35	0.89±0.02	0.89±0.02	0.89±0.02
20:0	0.09±0.02	0.01±0.00	0.16±0.02	0.14±0.01	0.03±0.00	0.14±0.01	0.14±0.01	0.02±0.00	0.11±0.04	0.02±0.00	0.10±0.01	0.10±0.01	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
20:1(n-9)	1.25±0.13	0.17±0.02	2.60±0.11	2.55±0.14	0.47±0.01	2.55±0.14	2.55±0.14	0.34±0.04	2.01±0.33	0.37±0.04	1.99±0.25	1.99±0.25	0.45±0.04	0.45±0.04	0.45±0.04
20:2(n-9)	0.05±0.00	0.01±0.00	0.11±0.00	0.09±0.02	0.02±0.00	0.09±0.02	0.09±0.02	0.01±0.00	0.08±0.00	0.02±0.00	0.08±0.00	0.08±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
20:3(n-5)	0.38±0.02	0.05±0.00	0.56±0.02	0.62±0.05	0.10±0.02	0.56±0.02	0.56±0.02	0.08±0.00	0.51±0.02	0.09±0.00	0.47±0.01	0.47±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01
20:4(n-6)	2.51±0.12	0.35±0.02	3.95±0.35	4.76±0.53	0.70±0.09	4.76±0.53	4.76±0.53	0.64±0.04	3.88±0.41	0.71±0.01	3.62±0.26	3.62±0.26	0.81±0.01	0.81±0.01	0.81±0.01
20:4(n-3)	0.87±0.03	0.12±0.01	1.57±0.11	1.77±0.13	0.28±0.02	1.77±0.13	1.77±0.13	0.24±0.03	1.41±0.11	0.26±0.02	1.25±0.12	1.25±0.12	0.28±0.03	0.28±0.03	0.28±0.03
20:5(n-3)	0.35±0.02	0.03±0.00	0.56±0.07	0.72±0.02	0.10±0.01	0.72±0.02	0.72±0.02	0.10±0.02	0.48±0.05	0.09±0.00	0.46±0.09	0.46±0.09	0.10±0.01	0.10±0.01	0.10±0.01
22:0	0.10±0.03	0.01±0.00	0.27±0.03	0.06±0.00	0.05±0.00	0.27±0.03	0.27±0.03	0.01±0.00	0.16±0.02	0.03±0.00	0.17±0.02	0.17±0.02	0.04±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00
22:1	0.15±0.02	0.02±0.00	0.27±0.01	0.32±0.05	0.05±0.01	0.32±0.05	0.32±0.05	0.04±0.00	0.27±0.01	0.05±0.00	0.23±0.02	0.23±0.02	0.05±0.00	0.05±0.00	0.05±0.00
22:5(n-3)	2.00±0.18	0.26±0.03	0.86±0.02	1.12±0.11	0.15±0.01	1.12±0.11	1.12±0.11	0.15±0.02	0.78±0.07	0.14±0.02	0.77±0.05	0.77±0.05	0.17±0.02	0.17±0.02	0.17±0.02
22:6(n-3)	3.07±0.31	0.42±0.02	6.03±0.33	7.50±0.45	1.01±0.11	7.50±0.45	7.50±0.45	0.99±0.07	4.68±0.19	0.86±0.03	5.13±0.24	5.13±0.24	1.15±0.11	1.15±0.11	1.15±0.11
Saturados	52.01±4.89	7.18±0.36	39.01±1.17	37.00±0.36	7.03±0.27	37.00±0.36	37.00±0.36	5.05±0.25	43.72±1.93	8.00±0.49	43.61±2.36	43.61±2.36	9.75±0.23	9.75±0.23	9.75±0.23
Monounsaturados	29.61±2.5d	4.08±0.39	32.39±1.1b	32.40±3.4a	5.87±0.33	32.40±3.4a	32.40±3.4a	4.38±0.27	31.74±0.5c	5.82±0.46	31.62±0.4c	31.62±0.4c	7.09±0.52	7.09±0.52	7.09±0.52
Poliinsaturados	18.37±1.4a	2.52±0.18	28.59±1.1c	30.60±2.0b	5.15±0.49	30.60±2.0b	30.60±2.0b	4.14±0.37	24.54±1.6b	4.51±0.60	24.78±2.0b	24.78±2.0b	5.57±0.79	5.57±0.79	5.57±0.79
ω -3	8.89±0.78	1.23±0.13	15.93±0.95	18.34±0.14	2.86±0.25	18.34±0.14	18.34±0.14	2.42±0.21	13.23±0.59	2.43±0.27	13.75±1.36	13.75±1.36	3.09±0.30	3.09±0.30	3.09±0.30
ω -6	6.74±0.50	0.93±0.02	10.62±0.24	11.37±1.29	1.92±0.14	11.37±1.29	11.37±1.29	1.54±0.11	9.57±0.83	1.76±0.13	9.30±0.79	9.30±0.79	2.09±0.26	2.09±0.26	2.09±0.26
ω -3/ ω -6	1.30±0.1a	1.30±0.14	1.50±0.1d	1.65±0.0e	1.50±0.09	1.65±0.0e	1.65±0.0e	1.65±0.04	1.39±0.1b	1.39±0.06	1.48±0.1c	1.48±0.1c	1.48±0.14	1.48±0.14	1.48±0.14
DHA	3.07±0.3a	0.42±0.02	6.03±0.3d	7.50±0.4e	1.01±0.11	7.50±0.4e	7.50±0.4e	0.99±0.07	4.68±0.2b	0.86±0.03	5.13±0.2c	5.13±0.2c	1.15±0.11	1.15±0.11	1.15±0.11
EPA	0.25±0.02	0.03±0.00	0.56±0.07	0.72±0.02	0.10±0.01	0.72±0.02	0.72±0.02	0.10±0.02	0.48±0.05	0.09±0.00	0.46±0.04	0.46±0.04	0.10±0.01	0.10±0.01	0.10±0.01
DHA/EPA	8.77±1.2a	8.77±1.25	10.76±1.1c	10.42±1.1c	10.76±1.15	10.42±1.1c	10.42±1.1c	10.42±1.14	9.75±0.8b	9.75±0.77	11.15±0.9d	11.15±0.9d	11.15±0.87	11.15±0.87	11.15±0.87
EPA/DHA	0.08±0.00	0.08±0.00	0.09±0.02	0.10±0.01	0.09±0.02	0.10±0.01	0.10±0.01	0.10±0.01	0.10±0.02	0.10±0.02	0.09±0.02	0.09±0.02	0.09±0.02	0.09±0.02	0.09±0.02
DHA/DHA	1.22±0.10a	1.22±0.10a	1.53±0.14c	1.58±0.13c	1.53±0.14c	1.58±0.13c	1.58±0.13c	1.58±0.13c	1.21±0.1a	1.21±0.1a	1.42±0.1b	1.42±0.1b	1.42±0.1b	1.42±0.1b	1.42±0.1b
Total A.G.	±	13.78±0.7a	±	18.05±1.5b	±	13.57±0.6a	13.57±0.6a	13.57±0.6a	±	18.32±1.4b	±	18.32±1.4b	±	22.40±1.4c	22.40±1.4c
Total Lípidos	±	50.49±2.76	±	63.06±1.31	±	52.13±1.60	52.13±1.60	52.13±1.60	±	60.81±4.21	±	60.81±4.21	±	50.97±2.81	50.97±2.81

A.G. ácido graso, DHA, docosahexaenoico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0.05).

Tabla 6

Cultivo de *Artemia franciscana* alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso (cultivo semicontinuo) y elementos óptimos (modificado de Fábregas *et al.*, 1984). Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹

	Control	Silicio1,0mM	Selenio1,0mM	Calcio10,0mM	Magnesio10,0mM
Densidad celular (10⁶ cél.mL⁻¹ std)	46,87 ±4,38	51,62 ±3,29	77,17 ±4,37	61,07 ±5,18	52,67 ±5,78
Productividad (10⁹ céls.L⁻¹.día⁻¹)	15,80 ±1,62	15,49 ±1,39	23,15 ±2,37	18,32 ±1,42	17,06 ±1,57
F.O. celular					
%proteína en F.O.	33,07	28,22	30,89	32,93	31,67
% carboh. en F.O.	38,16	42,45	36,72	39,28	39,43
% lípidos en F.O.	28,77	29,33	32,38	27,80	28,90
F.O. Artemia					
%proteína en F.O.	53,46	51,55	61,28	54,72	55,52
% carboh. en F.O.	21,78	20,80	16,94	21,04	21,60
% lípidos en F.O.	24,74	27,65	21,78	24,23	22,88
Proteínas (pg.célula⁻¹ ± std)	3,91 ±0,07	5,80 ±0,09	3,92 ±0,18	4,56 ±0,10	5,91 ±0,28
Carbohidratos (pg.célula⁻¹ ± std)	4,51 ±0,39	8,73 ±0,46	4,66 ±0,28	5,44 ±0,27	7,36 ±0,56
Lípidos (pg.célula⁻¹ ± std)	3,40 ±0,15	6,03 ±0,34	4,10 ±0,28	3,85 ±0,36	5,39 ±0,17
Pe orgánico pg.cél⁻¹	11,81	20,56	12,68	13,84	18,65
Proteínas (µg.Artemia⁻¹ ±std)	63,84a ±10,92	77,02ab ±4,12	105,48c ±5,92	92,77bc ±7,54	78,96ab ±5,18
Carbohidratos (µg.Artemia⁻¹ ±std)	26,02a ±3,13	31,09cd ±1,80	29,15ab ±3,00	35,69d ±3,78	30,72bc ±2,89
Lípidos (µg.Artemia⁻¹ ±std)	29,55a ±1,91	41,31e ±3,34	37,50c ±2,94	41,09de ±2,98	32,55b ±2,40
Peso orgánico (µg.Artemia⁻¹)	119,41	149,42	172,13	169,55	142,23
Valor calórico (10⁻⁷ J.célula⁻¹)	3,05	5,26	3,35	3,54	4,80
Valor calórico (10⁻⁶ J.Artemia⁻¹)	3,14a	4,01c	4,51d	4,46d	3,70b
Peso seco (µg.mL⁻¹ ±std)	1591,53 ±33,80	1868,47 ±184,10	1960,53 ±146,89	1476,33 ±22,60	1510,33 ±42,63
Peso seco (pg.cel⁻¹ ±std)	13,73 ±1,44	25,12 ±2,07	15,65 ±1,58	17,26 ±1,37	22,96 ±1,81
Peso seco (µg.Artemia⁻¹ ±std)	126,69a ±13,93	158,99c ±16,13	183,04e ±15,91	179,55d ±17,04	150,83b ±12,76
Cenizas (pg.cel⁻¹ ±std)	1,92 ±0,14	4,55 ±0,41	2,97 ±0,16	3,42 ±0,27	4,31 ±0,28
Cenizas (µg.Artemia⁻¹ ±std)	7,28a ±0,30	9,58c ±0,54	10,91e ±1,27	10,00d ±1,62	8,60b ±0,72
Materia Orgánica (pg.cel⁻¹ ±std)	11,81 ±1,17	20,56 ±1,78	12,68 ±1,07	13,84 ±1,13	18,65 ±1,54
Materia Orgánica (µg.Artemia⁻¹ ±std)	119,41a ±11,89	149,42c ±9,10	172,13e ±12,64	169,55d ±12,48	142,23b ±11,04
Supervivencia (% ±std)	67,10a ±4,82	74,97d ±6,27	73,43c ±5,39	74,43d ±6,98	71,67b ±7,05
Longitud Total Artemia (mm.Artemia⁻¹)	4,44a ±0,39	4,64a ±0,4,05	4,53a ±0,16	4,67a ±0,33	4,71a ±0,41
Q_N celular (pg)	6,78 ±0,09	10,57 ±0,10	6,17 ±0,27	7,08 ±0,09	8,87 ±0,16
Q_C celular (pg)	67,57 ±0,77	110,64 ±1,22	62,31 ±1,78	74,09 ±1,39	94,76 ±2,37
RelaciónC:N(átomos)	8,54	9,30	8,97	8,97	8,65

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 7

**Cultivo de *Artemia franciscana* alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso (cultivo semicontinuo) y elementos óptimos (modificado de Fábregas *et al.*, 1984).
Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹**

	Control	Azufre0,1mM	Zinc1,0mM	Cobre1,0mM	Hierro20,0mM
Densidad celular (10⁶ cél.mL⁻¹ std)	33,00 ±2,62	48,75 ±3,96	31,50 ±2,67	34,50 ±3,65	23,75 ±2,15
Productividad (10⁹ céls.L⁻¹.día⁻¹)	9,90 ±0,76	14,63 ±1,38	9,45 ±0,79	10,35 ±0,92	7,13 ±0,56
F.O. celular					
%proteína en F.O.	40,12	37,71	44,58	36,20	36,38
% carboh. en F.O.	26,18	30,92	23,97	31,90	29,57
% lípidos en F.O.	33,69	31,36	31,46	31,89	34,04
F.O. Artemia					
%proteína en F.O.	55,60	64,88	52,92	49,23	51,45
% carboh. en F.O.	20,98	15,63	21,18	18,41	22,35
% lípidos en F.O.	23,42	19,48	25,90	32,36	26,20
Proteínas (pg.célula⁻¹ ± std)	4,45 ±0,18	4,75 ±0,50	6,09 ±0,52	4,46 ±0,35	4,91 ±0,38
Carbohidratos (pg.célula⁻¹ ± std)	2,91 ±0,19	3,89 ±0,28	3,28 ±0,29	4,70 ±0,18	3,99 ±0,17
Lípidos (pg.célula⁻¹ ± std)	3,74 ±0,26	3,94 ±0,14	4,30 ±0,19	4,09 ±0,27	4,59 ±0,10
Peso orgánico pg.cel⁻¹	11,10	12,59	13,67	12,83	13,48
Proteínas (µg.Artemia⁻¹ ±std)	55,34ab ±2,94	122,59c ±6,87	54,47a ±1,02	76,83bc ±4,46	51,66a ±2,45
Carbohidratos (µg.Artemia⁻¹ ±std)	20,86a ±1,35	29,54c ±1,04	21,80a ±1,75	28,73bc ±3,15	22,44ab ±1,56
Lípidos (µg.Artemia⁻¹ ±std)	23,31a ±1,49	36,82bc ±2,25	26,66ab ±1,30	50,50c ±3,29	26,31ab ±1,49
Peso orgánico (µg.Artemia⁻¹)	99,51	188,95	102,93	156,06	100,41
Valor calórico (10⁻⁷ J.célula⁻¹)	3,04	3,36	3,72	3,53	3,67
Valor calórico (10⁻⁶ J.Artemia⁻¹)	2,60a	4,90d	2,73b	4,33c	2,66b
Peso seco (µg.mL⁻¹ ±std)	615,13 ±11,61	661,45 ±53,41	692,60 ±22,94	685,60 ±33,08	558,80 ±34,96
Peso seco (pg.cel⁻¹ ±std)	13,18 ±1,34	15,41 ±1,49	16,87 ±1,66	15,92 ±1,08	16,44 ±1,21
Peso seco (µg.Artemia⁻¹ ±std)	105,58a ±8,99	200,09d ±12,26	109,21ab ±9,01	165,66c ±14,89	106,53ab ±9,50
Cenizas (pg.cel⁻¹ ±std)	2,08 ±0,27	2,82 ±0,22	3,20 ±0,40	3,09 ±0,52	2,96 ±0,39
Cenizas (µg.Artemia⁻¹ ±std)	6,07a ±0,48	11,15d ±1,91	6,28ab ±0,18	9,60c ±0,72	6,12ab ±0,70
Materia Orgánica (pg.cel⁻¹ ±std)	11,10 ±1,20	12,59 ±1,28	13,67 ±0,63	12,83 ±0,57	13,48 ±1,56
Materia Orgánica (µg.Artemia⁻¹ ±std)	99,51a ±7,55	188,95d ±14,42	102,93ab ±10,41	156,06c ±6,23	106,53ab ±11,64
Supervivencia (% ± std)	66,90a ±4,15	87,90b ±5,26	89,90c ±6,35	92,47d ±7,65	91,00c ±8,37
Long Total Artemia (mm.Artemia⁻¹)	3,67a ±0,47	4,34d ±0,15	4,01b ±0,43	5,20e ±0,23	4,13c ±0,26
Q_N celular (pg)	7,26 ±0,06	7,94 ±0,10	7,99 ±0,17	8,21 ±0,03	8,29 ±0,17
Q_C celular (pg)	67,12 ±0,96	69,80 ±1,07	75,12 ±0,86	73,16 ±0,51	74,39 ±0,95
RelaciónC:N(átomos)	7,92	7,54	8,06	7,64	7,69

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

<div> <div>Tabla 8</div> <div>Absorción atómica de elementos en <i>Artemia franciscana</i> alimentada con <i>Isochrysis galbana</i> var. T-iso (cultivo semicontinuo) y elementos en concentraciones óptimas (modificado de Fábregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%/día⁻¹</div> </div>			
Absorción Atómica	<i>Artemia</i> sin Adición elemento	Absorción Atómica	<i>Artemia</i> con Adición elemento
Mg[0]mM (µg. <i>Artemia</i> ⁻¹)	0,12 ±0,013	Mg[10,0]mM (µg. <i>Artemia</i> ⁻¹)	1,18d ±0,150
Mg[0]mM (pg.cél ⁻¹)	0,44 ±0,03	Mg[10,0]mM (pg.cél ⁻¹)	0,63 ±0,07
Se[0]mM (µg. <i>Artemia</i> ⁻¹)	0,014 ±0,03	Se[1,0]mM (µg. <i>Artemia</i> ⁻¹)	0,55b ±0,045
Se[0]mM (fg.cél ⁻¹)	0,28 ±0,01	Se[1,0]mM (fg.cél ⁻¹)	0,63 ±0,02
Si[0]mM (µg. <i>Artemia</i> ⁻¹)	0,041 ±0,003	Si[1,0]mM (µg. <i>Artemia</i> ⁻¹)	0,40a ±0,01
Si[0]mM (fg.cél ⁻¹)	0,64 ±0,05	Si[1,0]mM (pg.cél ⁻¹)	1,84 ±0,13
Ca[0]mM (µg. <i>Artemia</i> ⁻¹)	0,25 ±0,03	Ca[10,0]mM (µg. <i>Artemia</i> ⁻¹)	1,15c ±0,15
Ca[0]mM (pg.cél ⁻¹)	0,15 ±0,01	Ca[10,0]mM (pg.cél ⁻¹)	0,25 ±0,017
Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0,05).			

<div> <div>Tabla 9</div> <div>Absorción atómica de elementos en <i>Artemia franciscana</i> alimentada con <i>Isochrysis galbana</i> var. T-iso (cultivo semicontinuo) y elementos en concentraciones óptimas (modificado de Fábregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%/día⁻¹</div> </div>			
Absorción Atómica	<i>Artemia</i> sin Adición elementos	Absorción Atómica	<i>Artemia</i> con Adición elementos
Zn[0]mM (µg. <i>Artemia</i> ⁻¹)	0,042 ±0,003	Zn[1,0]mM (µg. <i>Artemia</i> ⁻¹)	0,43c ±0,03
Zn[0]mM (fg.cél ⁻¹)	2,0 ±0,13	Zn[1,0]mM (fg.cél ⁻¹)	2,98 ±0,14
S[0]mM (µg. <i>Artemia</i> ⁻¹)	0,39 ±0,036	S[0,1]mM (µg. <i>Artemia</i> ⁻¹)	0,65d ±0,013
S[0]mM mM (pg.cél ⁻¹)	0,16 ±0,015	S[0,1]mM mM (pg.cél ⁻¹)	0,17 ±0,013
Cu[0]mM (µg. <i>Artemia</i> ⁻¹)	0,0085 ±0,00	Cu[1,0]mM (µg. <i>Artemia</i> ⁻¹)	0,056a ±0,003
Cu[0]mM (fg.cél ⁻¹)	0,092 ±0,00	Cu[1,0]mM (fg.cél ⁻¹)	0,11 ±0,02
Fe[0]mM (µg. <i>Artemia</i> ⁻¹)	0,027 ±0,006	Fe[20,0]mM (µg. <i>Artemia</i> ⁻¹)	0,061b ±0,005
Fe[0]mM (fg.cél ⁻¹)	0,79 ±0,05	Fe[20,0]mM (fg.cél ⁻¹)	6,0 ±0,40
Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (<i>p</i> <0,05).			

Tabla 10. Composición de Ácidos Grasos *Artemia franciscana* (% del total A.G.), ácidos grasos x Artemia (A.G. $\mu\text{g. artemia}^{-1}$) y lípidos totales x Artemia ($\mu\text{g. artemia}^{-1}$) alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes concentraciones (mM) de elementos.

	(Control)				[Mg10,0]				[Se1,0]				[S11,0]				[Ca10,0]			
	%A.G.	$\mu\text{g. artemia}^{-1}$	%A.G.	$\mu\text{g. artemia}^{-1}$	%A.G.	$\mu\text{g. artemia}^{-1}$	%A.G.	$\mu\text{g. artemia}^{-1}$	%A.G.	$\mu\text{g. artemia}^{-1}$	%A.G.	$\mu\text{g. artemia}^{-1}$	%A.G.	$\mu\text{g. artemia}^{-1}$	%A.G.	$\mu\text{g. artemia}^{-1}$	%A.G.	$\mu\text{g. artemia}^{-1}$	%A.G.	$\mu\text{g. artemia}^{-1}$
Acido Graso																				
12:0	0.20±0.01	0.02±0.01	0.13±0.02	0.02±0.00	0.13±0.04	0.01±0.00	0.11±0.02	0.01±0.00	0.11±0.02	0.01±0.00	0.10±0.03	0.01±0.00	0.11±0.02	0.01±0.00	0.10±0.03	0.01±0.00	0.10±0.03	0.01±0.00	0.10±0.03	0.01±0.00
14:0	8.44±0.59	0.70±0.06	8.42±0.55	1.03±0.14	11.41±1.17	1.10±0.12	11.75±0.54	1.10±0.12	11.75±0.54	1.38±0.13	8.53±0.17	1.38±0.13	11.75±0.54	1.38±0.13	8.53±0.17	1.38±0.13	8.53±0.17	0.87±0.01	8.53±0.17	0.87±0.01
15:0	0.61±0.03	0.05±0.00	0.36±0.02	0.04±0.00	0.41±0.04	0.04±0.00	0.52±0.03	0.04±0.00	0.52±0.03	0.06±0.00	0.37±0.02	0.06±0.00	0.52±0.03	0.06±0.00	0.37±0.02	0.06±0.00	0.37±0.02	0.04±0.00	0.37±0.02	0.04±0.00
16:0	20.25±1.47	1.68±0.15	17.43±1.89	2.13±0.16	22.30±1.25	2.13±0.27	20.85±0.28	2.13±0.27	20.85±0.28	2.44±0.10	17.80±1.05	2.44±0.10	20.85±0.28	2.44±0.10	17.80±1.05	2.44±0.10	17.80±1.05	1.80±0.19	17.80±1.05	1.80±0.19
16:1(n-7)	5.65±0.10	0.47±0.02	5.41±0.60	0.66±0.05	6.55±0.49	0.63±0.02	6.18±0.42	0.63±0.02	6.18±0.42	0.72±0.05	6.05±0.26	0.72±0.05	6.18±0.42	0.72±0.05	6.05±0.26	0.72±0.05	6.05±0.26	0.61±0.08	6.05±0.26	0.61±0.08
16:2(n-6)	0.38±0.03	0.03±0.00	0.35±0.03	0.04±0.00	0.39±0.03	0.04±0.00	0.31±0.01	0.04±0.00	0.31±0.01	0.04±0.00	0.30±0.03	0.04±0.00	0.31±0.01	0.04±0.00	0.30±0.03	0.04±0.00	0.30±0.03	0.03±0.01	0.30±0.03	0.03±0.01
16:2(n-4)	0.24±0.03	0.02±0.00	0.26±0.02	0.03±0.01	0.30±0.03	0.03±0.00	0.24±0.03	0.03±0.00	0.24±0.03	0.03±0.01	0.25±0.02	0.03±0.01	0.24±0.03	0.03±0.01	0.25±0.02	0.03±0.01	0.25±0.02	0.03±0.01	0.25±0.02	0.03±0.01
18:0	7.83±0.31	0.65±0.02	7.55±0.89	0.90±0.03	9.07±0.21	0.87±0.02	10.35±0.18	0.87±0.02	10.35±0.18	1.21±0.07	10.35±0.44	1.21±0.07	10.35±0.18	1.21±0.07	10.35±0.44	1.21±0.07	10.35±0.44	1.05±0.14	10.35±0.44	1.05±0.14
18:1(n-9)	29.44±2.88	2.43±0.19	28.20±2.88	3.42±0.09	30.82±1.58	2.94±0.13	30.69±1.74	2.94±0.13	30.69±1.74	3.59±0.31	31.77±0.58	3.59±0.31	30.69±1.74	3.59±0.31	31.77±0.58	3.59±0.31	31.77±0.58	3.23±0.48	31.77±0.58	3.23±0.48
18:1(n-7)	8.31±0.14	0.69±0.08	7.10±0.10	0.86±0.08	6.03±0.45	0.57±0.02	5.90±0.57	0.57±0.02	5.90±0.57	0.69±0.01	6.47±0.50	0.69±0.01	5.90±0.57	0.69±0.01	6.47±0.50	0.69±0.01	6.47±0.50	0.66±0.01	6.47±0.50	0.66±0.01
18:2(n-6)	4.23±0.17	0.35±0.01	3.56±0.28	0.43±0.04	3.21±0.22	0.31±0.02	2.73±0.05	0.31±0.02	2.73±0.05	0.32±0.02	3.93±0.35	0.32±0.02	2.73±0.05	0.32±0.02	3.93±0.35	0.32±0.02	3.93±0.35	0.40±0.05	3.93±0.35	0.40±0.05
18:3(n-6)	0.34±0.02	0.03±0.00	0.19±0.02	0.02±0.00	0.16±0.01	0.02±0.00	0.12±0.00	0.02±0.00	0.12±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00	0.12±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
18:3(n-3)	4.13±0.12	0.34±0.00	12.62±1.69	1.76±0.24	2.70±0.11	0.26±0.01	2.67±0.26	0.26±0.01	2.67±0.26	0.31±0.03	3.68±0.23	0.31±0.03	2.67±0.26	0.31±0.03	3.68±0.23	0.31±0.03	3.68±0.23	0.37±0.04	3.68±0.23	0.37±0.04
18:4(n-3)	4.09±0.28	0.34±0.03	3.81±0.29	0.46±0.03	3.01±0.57	0.29±0.04	3.19±0.28	0.29±0.04	3.19±0.28	0.37±0.04	4.65±0.37	0.37±0.04	3.19±0.28	0.37±0.04	4.65±0.37	0.37±0.04	4.65±0.37	0.47±0.01	4.65±0.37	0.47±0.01
20:0	0.14±0.00	0.01±0.00	0.14±0.01	0.02±0.00	0.10±0.01	0.01±0.00	0.11±0.01	0.01±0.00	0.11±0.01	0.01±0.00	0.10±0.01	0.01±0.00	0.11±0.01	0.01±0.00	0.10±0.01	0.01±0.00	0.10±0.01	0.01±0.00	0.10±0.01	0.01±0.00
20:1(n-9)	0.25±0.07	0.02±0.01	0.21±0.02	0.03±0.00	0.12±0.01	0.01±0.00	0.15±0.00	0.01±0.00	0.15±0.00	0.02±0.00	0.20±0.04	0.02±0.00	0.15±0.00	0.02±0.00	0.20±0.04	0.02±0.00	0.20±0.04	0.02±0.00	0.20±0.04	0.02±0.00
20:2(n-9)	0.14±0.00	0.01±0.00	0.11±0.01	0.01±0.00	0.08±0.00	0.01±0.00	0.09±0.00	0.01±0.00	0.09±0.00	0.01±0.00	0.11±0.01	0.01±0.00	0.09±0.00	0.01±0.00	0.11±0.01	0.01±0.00	0.11±0.01	0.01±0.00	0.11±0.01	0.01±0.00
20:3(n-5)	1.16±0.07	0.10±0.00	0.92±0.02	0.11±0.02	0.61±0.02	0.06±0.02	0.67±0.02	0.06±0.02	0.67±0.02	0.08±0.01	0.91±0.07	0.08±0.01	0.67±0.02	0.08±0.01	0.91±0.07	0.08±0.01	0.91±0.07	0.09±0.02	0.91±0.07	0.09±0.02
20:4(n-6)	2.72±0.21	0.23±0.01	2.84±0.18	0.03±0.01	1.54±0.16	0.14±0.01	1.98±0.13	0.14±0.01	1.98±0.13	0.23±0.02	2.69±0.16	0.23±0.02	1.98±0.13	0.23±0.02	2.69±0.16	0.23±0.02	2.69±0.16	0.27±0.03	2.69±0.16	0.27±0.03
20:4(n-3)	0.24±0.00	0.02±0.00	0.23±0.02	0.32±0.05	0.16±0.01	0.02±0.00	0.17±0.02	0.02±0.00	0.17±0.02	0.02±0.00	0.26±0.02	0.02±0.00	0.17±0.02	0.02±0.00	0.26±0.02	0.02±0.00	0.26±0.02	0.03±0.00	0.26±0.02	0.03±0.00
20:5(n-3)	0.52±0.01	0.04±0.01	0.36±0.04	0.04±0.00	0.26±0.01	0.02±0.00	0.32±0.04	0.02±0.00	0.32±0.04	0.04±0.00	0.39±0.05	0.04±0.00	0.32±0.04	0.04±0.00	0.39±0.05	0.04±0.00	0.39±0.05	0.04±0.01	0.39±0.05	0.04±0.01
22:0	0.16±0.01	0.01±0.00	0.15±0.02	0.02±0.00	0.12±0.01	0.01±0.00	0.19±0.02	0.01±0.00	0.19±0.02	0.02±0.00	0.11±0.01	0.02±0.00	0.19±0.02	0.02±0.00	0.11±0.01	0.02±0.00	0.11±0.01	0.01±0.00	0.11±0.01	0.01±0.00
22:1	0.20±0.05	0.02±0.00	0.16±0.01	0.02±0.00	0.20±0.03	0.02±0.00	0.16±0.02	0.02±0.00	0.16±0.02	0.02±0.00	0.16±0.02	0.02±0.00	0.16±0.02	0.02±0.00	0.16±0.02	0.02±0.00	0.16±0.02	0.02±0.00	0.16±0.02	0.02±0.00
22:5	0.09±0.01	0.01±0.00	0.10±0.02	0.01±0.00	0.05±0.00	0.00±0.00	0.10±0.02	0.00±0.00	0.10±0.02	0.01±0.00	0.10±0.02	0.01±0.00	0.10±0.02	0.01±0.00	0.10±0.02	0.01±0.00	0.10±0.02	0.01±0.00	0.10±0.02	0.01±0.00
22:6(n-3)	0.44±0.01	0.04±0.00	0.48±0.04	0.06±0.00	0.54±0.00	0.05±0.00	0.63±0.01	0.05±0.00	0.63±0.01	0.07±0.00	0.58±0.05	0.07±0.00	0.63±0.01	0.07±0.00	0.58±0.05	0.07±0.00	0.58±0.05	0.06±0.00	0.58±0.05	0.06±0.00
Saturados	37.64±4.42	3.12±0.42	34.17±3.78	4.15±0.11	43.52±2.93	4.18±0.65	43.88±0.52	4.18±0.65	43.88±0.52	5.14±0.30	37.36±1.34	5.14±0.30	43.88±0.52	5.14±0.30	37.36±1.34	5.14±0.30	37.36±1.34	3.78±0.44	37.36±1.34	3.78±0.44
Monounsaturados	43.85±3.9b	3.63±0.25	41.08±3.5a	4.99±0.20	43.72±1.4c	4.17±0.29	43.08±1.8c	4.17±0.29	43.08±1.8c	5.05±0.42	44.65±0.7b	5.05±0.42	43.08±1.8c	5.05±0.42	44.65±0.7b	5.05±0.42	44.65±0.7b	4.54±0.72	44.65±0.7b	4.54±0.72
Poliinsaturados	18.72±0.3a	1.55±0.00	24.87±1.3c	3.23±0.20	12.89±1.7a	1.22±0.21	13.15±1.5a	1.22±0.21	13.15±1.5a	1.54±0.13	18.09±1.3b	1.54±0.13	13.15±1.5a	1.54±0.13	18.09±1.3b	1.54±0.13	18.09±1.3b	1.85±0.13	18.09±1.3b	1.85±0.13
ω -3	9.42±0.03	0.78±0.02	17.49±1.82	2.35±0.22	7.42±0.73	0.68±0.02	6.92±0.19	0.68±0.02	6.92±0.19	0.81±0.01	9.56±0.67	0.81±0.01	6.92±0.19	0.81±0.01	9.56±0.67	0.81±0.01	9.56±0.67	0.98±0.02	9.56±0.67	0.98±0.02
ω -6	7.67±0.34	0.63±0.02	5.99±0.50	0.71±0.02	5.30±0.52	0.50±0.03	5.13±0.17	0.50±0.03	5.13±0.17	0.60±0.03	7.15±0.52	0.60±0.03	5.13±0.17	0.60±0.03	7.15±0.52	0.60±0.03	7.15±0.52	0.73±0.01	7.15±0.52	0.73±0.01
ω -3/ ω -6	1.23±0.1a	1.23±0.06	2.92±0.2d	2.92±0.25	1.40±0.2c	1.40±0.25	1.34±0.1b	1.40±0.25	1.34±0.1b	1.34±0.19	1.34±0.0b	1.34±0.19	1.34±0.1b	1.34±0.19	1.34±0.0b	1.34±0.19	1.34±0.0b	1.34±0.02	1.34±0.0b	1.34±0.02
DHA	0.44±0.0a	0.04±0.00	0.48±0.0a	0.06±0.00	0.54±0.0b	0.05±0.00	0.57±0.0c	0.05±0.00	0.57±0.0c	0.07±0.01	0.58±0.0c	0.07±0.01	0.57±0.0c	0.07±0.01	0.58±0.0c	0.07±0.01	0.58±0.0c	0.06±0.00	0.58±0.0c	0.06±0.00
EPA	0.52±0.0d	0.04±0.01	0.36±0.0c	0.04±0.00	0.26±0.0a	0.02±0.00	0.32±0.0b	0.02±0.00	0.32±0.0b	0.04±0.01	0.39±0.0c	0.04±0.01	0.32±0.0b	0.04±0.01	0.39±0.0c	0.04±0.01	0.39±0.0c	0.04±0.00	0.39±0.0c	0.04±0.00
DHA/EPA	0.88±0.0a	0.88±0.02	1.34±0.1b	1.34±0.09	2.07±0.2e	2.07±0.24	1.97±0.2d	2.07±0.24	1.97±0.2d	1.97±0.17	1.50±0.05	1.97±0.17	1.97±0.2d	1.97±0.17	1.50±0.05	1.97±0.17	1.50±0.05	1.50±0.05	1.50±0.05	1.50±0.05
EPA/DHA	1.18±0.10	1.18±0.10	0.75±0.05	0.75±0.05	0.48±0.04	0.48±0.04	0.56±0.04	0.48±0.04	0.56±0.04	0.56±0.04	0.66±0.05	0.56±0.04	0.56±0.04	0.56±0.04	0.66±0.05	0.56±0.04	0.66±0.05	0.66±0.05	0.66±0.05	0.66±0.05
DHA/ARA	0.16±0.01	0.17±0.01	0.17±0.01	0.17±0.01	0.35±0.02	0.35±0.02	0.32±0.03	0.35±0.02	0.32±0.03	0.22±0.1	0.22±0.1	0.22±0.1	0.32±0.03	0.22±0.1	0.22±0.1	0.22±0.1	0.22±0.1	0.22±0.1	0.22±0.1	0.22±0.1
Total A.G.	±	8.28±0.2a	±	12.35±1.1e	±	9.56±0.8b	±	9.56±0.8b	±	11.71±0.6d	±	11.71±0.6d	±	11.71±0.6d	±	11.71±0.6d	±	10.16±1.1c	11.71±0.6d	10.16±1.1c
Total Lípidos	±	29.55±1.91	±	32.55±2.40	±	37.50±2.94	±	37.50±2.94	±	41.31±3.34	±	41.31±3.34	±	41.31±3.34	±	41.31±3.34	±	41.09±2.98	41.31±3.34	41.09±2.98

A.G. ácido graso, DHA, docosahexaenoico. Los valores aquí presentes son la media \pm SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0.05$).

Tabla 11. Composición de Ácidos Grasos *Artemia franciscana* (% del total A.G.), ácidos grasos x Artemia (A.G. µg.artemia⁻¹) y lípidos totales x Artemia (µg.artemia⁻¹) alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes concentraciones de elementos.

Acido Graso	(Control)			[S0.1]			[Zn1.0]			[Cu1.0]			[Fe20.0]		
	%A.G.	µg.artemia ⁻¹	%A.G.	%A.G.	µg.artemia ⁻¹	%A.G.	%A.G.	µg.artemia ⁻¹	%A.G.	%A.G.	µg.artemia ⁻¹	%A.G.	%A.G.	µg.artemia ⁻¹	µg.artemia ⁻¹
12:0	0.24±0.01	0.01±0.00	1.41±0.07	0.06±0.00	0.15±0.01	0.01±0.00	0.14±0.00	0.01±0.00	0.14±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.17±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
14:0	4.04±0.25	0.15±0.01	5.85±0.58	0.24±0.02	8.08±0.26	0.37±0.02	9.80±0.72	0.96±0.02	9.80±0.72	0.96±0.02	0.96±0.02	6.40±0.63	0.33±0.02	0.33±0.02	0.33±0.02
15:0	0.44±0.02	0.02±0.00	0.86±0.01	0.03±0.00	0.66±0.03	0.03±0.00	0.54±0.02	0.04±0.00	0.54±0.02	0.04±0.00	0.04±0.00	0.62±0.02	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00
16:0	14.46±0.24	0.54±0.01	19.43±1.96	0.79±0.03	18.19±0.81	0.87±0.04	19.43±1.42	0.87±0.04	19.43±1.42	0.87±0.04	1.92±0.13	16.47±1.16	0.84±0.01	0.84±0.01	0.84±0.01
16:1(n-7)	4.13±0.65	0.13±0.01	6.13±0.43	0.25±0.01	6.78±0.23	0.27±0.03	5.95±0.37	0.43±0.03	5.95±0.37	0.43±0.03	0.43±0.03	6.41±0.29	0.29±0.02	0.29±0.02	0.29±0.02
16:2(n-6)	0.34±0.01	0.01±0.00	0.70±0.01	0.03±0.00	0.49±0.02	0.02±0.00	0.48±0.04	0.04±0.00	0.48±0.04	0.04±0.00	0.04±0.00	0.49±0.03	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
16:2(n-4)	0.26±0.01	0.01±0.00	0.43±0.02	0.02±0.00	0.25±0.03	0.01±0.00	0.24±0.02	0.02±0.00	0.24±0.02	0.02±0.00	0.02±0.00	0.27±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
18:0	9.75±0.62	0.36±0.04	12.17±1.54	0.50±0.03	6.61±0.11	0.31±0.01	5.96±0.11	0.29±0.02	5.96±0.11	0.29±0.02	0.29±0.02	7.96±0.86	0.41±0.03	0.41±0.03	0.41±0.03
18:1(n-9)	25.95±1.17	1.02±0.46	24.75±1.42	0.95±0.05	27.20±2.38	1.34±0.12	33.02±1.50	3.29±0.48	33.02±1.50	3.29±0.48	3.29±0.48	27.15±2.13	1.42±0.12	1.42±0.12	1.42±0.12
18:1(n-7)	9.26±0.88	0.35±0.02	10.54±0.80	0.40±0.02	9.86±0.75	0.41±0.02	8.50±0.18	0.54±0.02	8.50±0.18	0.54±0.02	0.54±0.02	10.56±0.54	0.54±0.01	0.54±0.01	0.54±0.01
18:2(n-6)	5.07±0.60	0.19±0.01	4.84±0.65	0.19±0.01	4.82±0.33	0.22±0.02	5.47±0.10	0.32±0.02	5.47±0.10	0.32±0.02	0.32±0.02	4.82±0.56	0.24±0.02	0.24±0.02	0.24±0.02
18:3(n-6)	0.39±0.01	0.01±0.00	0.50±0.01	0.02±0.00	4.71±0.67	0.22±0.02	4.91±0.10	0.37±0.02	4.91±0.10	0.37±0.02	0.37±0.02	6.16±0.31	0.31±0.02	0.31±0.02	0.31±0.02
18:3(n-3)	5.21±0.43	0.19±0.01	4.97±0.12	0.20±0.01	0.45±0.02	0.02±0.00	0.41±0.03	0.02±0.00	0.41±0.03	0.02±0.00	0.02±0.00	0.46±0.02	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
18:4(n-3)	4.65±0.38	0.17±0.02	6.23±0.84	0.25±0.02	7.45±0.59	0.27±0.01	5.70±0.50	0.39±0.02	5.70±0.50	0.39±0.02	0.39±0.02	7.65±0.65	0.36±0.01	0.36±0.01	0.36±0.01
20:0	0.24±0.01	0.01±0.00	0.27±0.05	0.01±0.00	0.17±0.01	0.01±0.00	0.14±0.01	0.01±0.00	0.14±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00	0.15±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
20:1(n-9)	0.31±0.02	0.01±0.00	0.11±0.03	0.00±0.00	0.25±0.02	0.01±0.00	0.30±0.01	0.02±0.00	0.30±0.01	0.02±0.00	0.02±0.00	0.38±0.01	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
20:2(n-9)	0.17±0.01	0.01±0.00	0.18±0.01	0.01±0.00	0.23±0.01	0.01±0.00	0.45±0.05	0.04±0.00	0.45±0.05	0.04±0.00	0.04±0.00	0.14±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
20:3(n-5)	1.78±0.13	0.07±0.00	0.92±0.02	0.04±0.00	1.13±0.11	0.09±0.00	1.08±0.15	0.08±0.00	1.08±0.15	0.08±0.00	0.08±0.00	1.39±0.14	0.07±0.00	0.07±0.00	0.07±0.00
20:4(n-6)	4.26±0.44	0.16±0.01	3.17±0.025	0.13±0.01	3.50±0.21	0.14±0.01	3.96±0.37	0.26±0.02	3.96±0.37	0.26±0.02	0.26±0.02	3.59±0.20	0.18±0.02	0.18±0.02	0.18±0.02
20:4(n-3)	0.31±0.02	0.01±0.00	0.31±0.02	0.01±0.00	0.32±0.01	0.01±0.00	0.30±0.02	0.02±0.00	0.30±0.02	0.02±0.00	0.02±0.00	0.38±0.01	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
20:5(n-3)	0.76±0.03	0.03±0.00	0.56±0.01	0.02±0.00	0.53±0.03	0.03±0.00	0.65±0.02	0.04±0.00	0.65±0.02	0.04±0.00	0.04±0.00	0.65±0.05	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00
22:0	0.37±0.02	0.01±0.00	0.41±0.03	0.02±0.00	0.45±0.03	0.03±0.00	0.23±0.02	0.02±0.00	0.23±0.02	0.02±0.00	0.02±0.00	0.12±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
22:1	3.27±0.23	0.10±0.01	0.44±0.02	0.02±0.00	0.30±0.02	0.02±0.00	0.18±0.00	0.01±0.00	0.18±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.26±0.02	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
22:5(n-3)	0.12±0.01	0.00±0.00	0.14±0.01	0.01±0.00	0.13±0.01	0.01±0.00	0.10±0.01	0.01±0.00	0.10±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00	0.09±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
22:6(n-3)	0.51±0.04	0.02±0.00	0.82±0.02	0.03±0.00	1.07±0.10	0.04±0.00	0.74±0.02	0.08±0.00	0.74±0.02	0.08±0.00	0.08±0.00	0.67±0.04	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00
Saturados	29.56±2.23	1.10±0.18	40.40±1.49	1.65±0.17	33.77±2.25	1.61±0.14	32.91±3.57	2.43±0.14	32.91±3.57	2.43±0.14	2.43±0.14	31.88±0.77	1.63±0.26	1.63±0.26	1.63±0.26
Monounsaturados	46.62±4.7b	1.80±0.12	35.84±1.9b	1.42±0.13	42.86±2.0b	2.04±0.15	44.56±2.4c	3.37±0.21	44.56±2.4c	3.37±0.21	3.37±0.21	44.04±3.6a	2.28±0.18	2.28±0.18	2.28±0.18
Poliinsaturados	23.82±2.4b	0.87±0.05	23.76±1.6b	0.95±0.09	23.36±1.9b	1.05±0.12	22.53±2.1a	1.64±0.12	22.53±2.1a	1.64±0.12	1.64±0.12	24.08±2.9c	1.22±0.10	1.22±0.10	1.22±0.10
ω-3	11.44±0.82	0.42±0.01	12.89±1.12	0.51±0.04	12.65±1.56	0.56±0.01	11.55±1.35	0.87±0.06	11.55±1.35	0.87±0.06	0.87±0.06	14.28±1.23	0.72±0.01	0.72±0.01	0.72±0.01
ω-6	10.05±1.02	0.37±0.03	7.87±0.41	0.32±0.01	8.98±0.58	0.40±0.02	9.10±0.62	0.63±0.04	9.10±0.62	0.63±0.04	0.63±0.04	7.90±0.26	0.40±0.01	0.40±0.01	0.40±0.01
ω-3/ω-6	1.13±0.1a	1.13±0.11	1.64±0.1d	1.64±0.15	1.41±0.1c	1.41±0.10	1.27±0.1b	1.27±0.12	1.27±0.1b	1.27±0.12	1.27±0.12	1.81±0.1e	1.81±0.14	1.81±0.14	1.81±0.14
DHA	0.51±0.0a	0.02±0.00	0.82±0.0d	0.03±0.00	1.07±0.1e	0.04±0.00	0.74±0.0c	0.08±0.00	0.74±0.0c	0.08±0.00	0.08±0.00	0.67±0.0b	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00
EPA	0.76±0.0c	0.03±0.00	0.56±0.0a	0.02±0.00	0.53±0.0a	0.03±0.00	0.65±0.0b	0.04±0.00	0.65±0.0b	0.04±0.00	0.04±0.00	0.65±0.0b	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00
DHA/EPA	0.67±0.0a	0.67±0.01	1.46±0.1c	1.46±0.15	2.02±0.1d	2.02±0.23	1.14±0.1b	1.14±0.13	1.14±0.1b	1.14±0.13	1.14±0.13	1.03±0.1b	1.03±0.10	1.03±0.10	1.03±0.10
EPA/DHA	1.49±0.12	1.49±0.15	0.68±0.05	0.68±0.02	0.49±0.03	0.49±0.03	0.87±0.04	0.87±0.03	0.87±0.04	0.87±0.03	0.87±0.03	0.97±0.05	0.97±0.03	0.97±0.03	0.97±0.03
DHA/ARA	0.12±	±	0.26±0.01	±	0.30±0.01	±	0.19±0.01	±	0.19±0.01	±	±	±	±	±	±
Total A.G.	±	3.78±0.3a	±	4.02±0.3b	±	4.71±0.4c	±	9.99±0.9e	±	9.99±0.9e	±	5.59±0.6d	±	5.59±0.6d	±
Total Lipidos	±	23.31±1.49	±	36.82±2.25	±	26.66±1.30	±	50.50±3.29	±	50.50±3.29	±	26.31±1.49	±	26.31±1.49	±

A.G. ácido graso, DHA, docosahexaenoico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0.05).

Capítulo 5

Reformulación del **Medio de Cultivo "ALGAL"** (Fábregas et al., 1984) por la incorporación en conjunto de los elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en concentraciones óptimas; en dos tipos de medio: **Algal Alto Rendimiento (AARPt, AARTISO)** y **Algal Incremento Concentración EPA y DHA (AEPA y ADHA)** para *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. T-iso respectivamente.

Introducción

Cada microalga posee necesidades específicas minerales que han de ser cuidadosamente calculadas con respecto a la concentración óptima de nutrientes (Becker and Venkataraman, 1982; Fábregas *et al.*,1985a; Fábregas and Herrero 1986; Fábregas *et al.*,1986a; Fábregas *et al.*,1986b; Mandalam-Ramkumar and Palsson-Bernhard 1998 Andersen, 2005). Las recetas de medios de cultivo actualmente disponibles, no siempre son adecuadas para muchas especies, y la elección exacta para una especie en particular depende de ensayo y error. Se debe recordar que en el cultivo en general existen o no métodos equivocados; los medios de cultivo se han desarrollado probando varias adiciones, generalmente basadas en consideraciones teóricas. El perfeccionamiento de la composición de los medios, para el mantenimiento en laboratorio de cultivos microalgales, han sido objeto de investigación por varias décadas, dando lugar a muchas recetas de diferentes medios que se informan en la literatura y que se utilizan en diferentes laboratorios (Harrison *et al.*,1980; Keller *et al.*,1987; Fábregas *et al.*, 2000; Berges *et al.*,2001; Barsanti and Gualtieri, 2006). Las formulaciones de medios de cultivo más empleadas hoy en día en acuicultura son: Erdschreiber (Foy 1934), f/2 (Guillard and Ryther, 1962), Walne 1970, Algal (Fábregas *et al.*,1984).

La nutrición y balance mineral es un área poco explotada en acuicultura, recibiendo poca atención en las distintas fases de la nutrición de organismos acuáticos. Algunos metales y metaloides son componentes importantes de enzimas, las cuales catalizan reacciones necesarias en la conversión y transformación de ácidos grasos además de coadyuvar contra daño oxidativo de las membranas celulares; y estar implicados estos macro y microelementos en importantes procesos como la supervivencia, metamorfosis, crecimiento y pigmentación a nivel larval.

Unos 30 elementos inorgánicos al menos así como muchos compuestos orgánicos pueden ser utilizados por las microalgas para su nutrición (Kaplan *et al.*,1990; Becker, 1994) distinta de C, N y P; así como también de importancia son el S, K, Na, Fe, Mg, Ca y oligoelementos tales como B, Cu, Mn, Zn, Mo, Co, V, y Se, como se refleja en la composición elemental de las microalgas (Salisbury and Ross, 1992; Marschner, 1995). Muchos de los oligoelementos son importantes en las reacciones enzimáticas y para la biosíntesis de bastantes compuestos, por ejemplo el Co es esencial para la producción de vitamina B₁₂. El silicio está presente en las paredes celulares de varias divisiones de microalgas, especialmente las diatomeas, la deposición de las estructuras celulares de silicio juegan un papel muy importante en el ciclo biogeoquímico del silicio (Montsant *et al.*,2005) y es un nutriente esencial para su crecimiento y producción (Healy, 1973). La limitación de silicio produce la acumulación de metabolitos secundarios de alto peso molecular (Arias *et al.*,2009).

Es en base a lo anteriormente descrito que se plantea importante la manipulación de la nutrición mineral en las microalgas como base de la cadena trófica siendo una herramienta importante que influye en la calidad bioquímica de estas; ahora bien es importante respondernos si la concentración de diferentes macro y microelementos influyen en la productividad y calidad bioquímica de las microalgas, y así mismo observar como responde la acumulación de estos elementos en concentraciones adecuadas en el siguiente nivel trófico (alimento vivo rotíferos y *Artemia*) desde el punto de vista bioquímico y del ciclo biológico de este nivel trófico.

Diseño experimental

Una vez realizada la incorporación de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en diferentes concentraciones en *Phaeodactylum tricornutum* (capítulo 1) e *Isochrysis galbana* var. T-iso (capítulo 2), se observó que concentraciones de Ca^{2+} [1,0], Mg^{2+} [1,0], Se^{2-} [1,0], Si^{4+} [1,0], Fe^{3+} [20,0], Zn^{2+} [0,1], Cu^{2+} [0,1], y S^{2-} [0,1] mostraron por separado un mayor desempeño en la generación de densidad celular en *Phaeodactylum tricornutum* (capítulo 1); en tanto que concentraciones de Ca^{2+} [1,0], Mg^{2+} [1,0], Se^{2-} [0,1], Si^{4+} [1,0], Fe^{3+} [20,0], Zn^{2+} [0,1], Cu^{2+} [0,1], y S^{2-} [1,0] nos indicaron por separado la mejor generación de concentraciones del ácido graso poliinsaturado eicosapentaenoico 20:5n-3 EPA (capítulo 1).

En lo que respecta a *Isochrysis galbana* var. T-iso concentraciones de Ca^{2+} [10,0], Mg^{2+} [10,0], Se^{2-} [1,0], Si^{4+} [1,0], Fe^{3+} [20,0], Zn^{2+} [1,0], Cu^{2+} [1,0], y S^{2-} [0,1] demostraron por separado un mayor desempeño en la generación de densidad celular; así mismo concentraciones de Ca^{2+} [1,0], Mg^{2+} [1,0], Se^{2-} [0,1], Si^{4+} [1,0], Fe^{3+} [20,0], Zn^{2+} [1,0], Cu^{2+} [1,0], y S^{2-} [1,0] revelaron por solitario la generación de mejores concentraciones del ácido graso poliinsaturado docosahexaenoico 22:6n-3 DHA (capítulo 2).

Es, con los anteriores resultados que se observo la posibilidad de incluir los diferentes macro y microelementos en el balance y reformulación del medio de cultivo "ALGAL" (Fábregas *et al.*, 1984), tomando en cuenta la importancia de dichos elementos en diferentes procesos fisiológicos necesarios a nivel celular, los cuales desencadenaron modificaciones en el perfil de ácidos grasos de las microalgas testadas, por lo que es posible dentro de ciertos límites manipularlas, ya sea sobre su metabolismo, modulando los parámetros de crecimiento microalgal; o la correlación entre los componentes del medio de cultivo (Carvalho *et al.*, 2006). La nutrición mineral y sus efectos en la variación de la composición del medio de cultivo en la producción de ácidos grasos y biomasa celular es viable, mediante la inclusión en el medio de cultivo de los elementos ya citados, los cuales además de cumplir en la células con funciones fisiológicas, coadyuvan en la calidad bioquímica de las mismas y estas a su vez funcionar como vehículo de transporte de dichos elementos a los siguientes niveles tróficos. Comportamientos similares a los reportados en el capítulo 1 y 2 de la presente disertación, con respecto a la cantidad de los ácidos grasos han sido manifestados por Feng *et al.*, 2005; los cuales concluyen que la adición en el medio de

cultivo de moléculas orgánicas e inorgánicas mejora la producción de lípidos y ácidos grasos poliinsaturados en microalgas.

Considerando lo anteriormente dicho, es que se dio origen a dos diferentes tipos de medios de cultivo, para la máxima generación de densidad celular; los cuales se denominaron **Algal Alto Rendimiento** *Isochrysis galbana* var. T-iso (**AARTISO**) y **Algal Alto Rendimiento** *Phaeodactylum tricornutum* (**AARPt**) ver *tabla 2* y *3*; los cuales se concibieron reconstituyendo el medio de cultivo "Algal Industrial" (**AI**) (*tabla 1*) con las concentraciones elementales antes descritas como óptimas. Tales medios de cultivo se prepararon en una concentración 4mM de NaNO_3 .

A la par se originaron además, otros dos tipos de medio de cultivo para obtener la máxima producción del ácido graso poliinsaturado eicosapentaenoico 20:5(n-3 EPA); en la microalga *Phaeodactylum tricornutum*, el cual se denominó *Algal-Incremento de la Cantidad de EPA* (**AEPA**) ver *tabla 4*, así como el *Algal-Incremento de la Cantidad de DHA* (**ADHA**) para obtener la máxima producción del ácido graso poliinsaturado docosahexaenoico 22:6(n-3 DHA) en *Isochrysis galbana* var. T-iso (ver *tabla 5*); ambos medios de cultivo fueron creados en base a la reformulación del medio de cultivo "Algal Industrial" (**AI**) con las concentraciones elementales óptimas antes descritas. Tales medios de cultivo se prepararon en una concentración 4mM de NaNO_3 .

Dichos medios fueron estudiados posteriormente, a fin de evaluar su efecto en cultivo con diferentes concentraciones de nitrógeno, sobre la generación de biomasa, composición bioquímica, e incorporación elemental celular en los capítulos 6 y 7.

Macro y microelementos son esenciales para el crecimiento microalgal, los cuales se incorporan dentro de moléculas orgánicas esenciales, en particular en una serie de factores coenzimáticos de reacciones fotosintéticas. De estos metales las concentraciones (o más exactamente la concentración biológicamente disponible) de Fe, Mn, Zn, Cu y Co (y algunas veces Mo y Se) en aguas naturales puede ser limitante, para el crecimiento microalgal. Se conoce poco sobre las complejas relaciones entre especiación química de metales y su disponibilidad biológica como nutriente.

El término nutriente es coloquialmente aplicado a un químico necesario en cantidades relativamente grandes, y que puede ser utilizado como elemento o compuesto necesario para el crecimiento microalgal.

Las concentraciones medias de los nutrientes de importancia biológica, encontrados en un agua de mar típica se dividen de acuerdo a Barsanti and Gualtieri, 2006, en tres grupos, los cuales son tipificados debido a una disminución en su concentración (*tabla 6*).

Grupo 1. La concentración de estos elementos no muestra una esencial variación en el agua de mar, es así que un alto crecimiento microalgal no los puede agotar en el medio de cultivo. Por lo tanto tales componentes en teoría no tendrían que añadirse a los medios de cultivo utilizando agua de mar natural; pero si es necesario añadirlos al agua de mar destilada cuando se elaboran medios de cultivo con agua de mar artificial (Barsanti and

Gualtieri, 2006). Sin embargo nuestras investigaciones han demostrado (capítulo 1 y 2) que introduciendo ciertas concentraciones óptimas, a mayores, de magnesio, calcio, y azufre de las ya presentes en el agua de mar, es posible influir sobre la generación de densidad celular y otras concentraciones más modificar la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados específicamente el EPA y DHA en las microalgas testadas.

Grupo 2. También poseen concentraciones muy constantes en el agua de mar, o pueden variar en un factor inferior a 5. Debido a que la biomasa microalgal en condiciones naturales no puede agotar sus concentraciones significativamente, por lo que "*no sería*" necesario añadir estos a los medios de cultivo con agua de mar natural. Los medios artificiales estándar (y algunos medios de agua de mar natural) añaden molibdeno (como molibdato), el cual es un nutriente esencial para las microalgas, el selenio (como selenito), el cual a sido demostrado es necesario para algunas microalgas, así como el estroncio, bromo y fluor; todos los cuales ocurren en concentraciones relativamente elevadas en el agua de mar, pero ninguno de los cuales han demostrado ser esenciales para el crecimiento microalgal (Barsanti and Gualtieri, 2006). Es en este grupo que el elemento selenio ha demostrado (capítulo 1 y 2) en diferentes concentraciones en el medio de cultivo "ALGAL" ser importante en la generación de biomasa y mejorar la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados principalmente el EPA Y DHA en *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. T-iso respectivamente.

Grupo 3. Todos los elementos de este grupo es conocido son necesarios para las microalgas (el silicio se ha mencionado es únicamente necesario para diatomeas así como algunas crisófitas; en tanto el níquel es necesario únicamente para formar ureasa, cuando las microalgas utilizan urea como fuente de nitrógeno). Estos nutrientes están generalmente presentes en bajas concentraciones en el agua de mar natural; por lo que las microalgas al requerir de cantidades substanciales, es que las concentraciones varían ampliamente (generalmente por un factor de 10 a 1000). Todos estos nutrientes (excepto el silicio y el níquel en algunas circunstancias) en general debieran añadirse a los medios de cultivo a fin de generar altas concentraciones de biomasa microalgal (Barsanti and Gualtieri, 2006). Los resultados generados en el capítulo 1 y 2 de la presente disertación, nos demuestran que no solo el silicio es necesario por las diatomeas como fue el caso de *Phaeodactylum tricornutum* (capítulo 1) para un mejor rendimiento celular y perfeccionamiento en concentración de su ácido graso poliinsaturado principal que es el EPA; si no que además dicho elemento expresó ser importante también para *Isochrysis galbana* var. T-iso para mejorar también su rendimiento celular y producción de DHA, ácido graso poliinsaturado importante en esta microalga.

Muy poco se sabe acerca del hierro en el agua de mar o los mecanismos de captación de las microalgas, debido a la compleja química del elemento. El cobre no parece ser un requisito necesario en las microalgas, o bien no necesitan, o necesitar cantidades muy pequeñas, las cuales pueden ser tomadas del agua de mar natural y ser suficientes para mantener tasas máximas de crecimiento (Barsanti and Gualtieri, 2006). Sin embargo dados los resultados del capítulo 1 y 2, hierro y cobre demostraron ser necesarios en concentraciones óptimas en

cultivos celulares en discontinuo y semicontinuo para generación máxima de crecimiento celular, así como modificar la concentración de ácidos grasos poliinsaturados importantes.

Los medios de cultivo pueden ser clasificados como definidos o indefinidos. Los medios definidos que son a menudo esenciales para estudios de nutrición, poseen componentes conocidos en su totalidad y a los cuales se les puede asignar una fórmula química. Los medios indefinidos, por el contrario contienen una o más ingredientes naturales o complejos, por ejemplo agar o extracto de hígado y el agua de mar, cuya composición es desconocida y puede variar.

Existe una gran variedad de medios de cultivo definidos e indefinidos para microalgas marinas reportados en la literatura, de los cuales los más comunes son: Walne's, ASN-III, CHU-11, PCR-S11, f/2, K, ESAW, ALGAL, denominados como de amplio espectro, por cubrir con las necesidades de la mayoría de las microalgas. Los cuales o algunos de ellos pueden poseer o no, en común uno o varios constituyentes-ingredientes. En la presente disertación como ya se definió anteriormente se testaron Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} por separado en la reconstitución del medio de cultivo "ALGAL" (capítulos 1 y 2); posteriormente en los capítulos 6 y 7 se introdujeron en conjunto en dicho medio, generándose 4 diferentes recetas ya descritas anteriormente (*tablas 2-5*), las cuales son consideradas como novedosas ya que en ninguno de los medios estimados como comunes, poseen dicha complejidad elemental así como de concentración óptima.

Tabla 1
ALGAL INDUSTRIAL 4 mM**

Fábregas, J., Abalde, J., Herrero C., Cabezas, B., and Veiga, M. 1984. Growth of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture* 42: 207-215.

SOLUCIÓN 1

Macro/microelementos	Concentración μM	Cantidad mg/L
ZnCl_2	1,0	27,26
$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	39,58
$\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,0	48,39
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1	4,76
CuSO_4	0,1	3,17
EDTA		374,0

Nota: disolver en 200 mL de agua destilada

SOLUCIÓN 2

$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	20	1051,88
---	----	---------

Nota: disolver en 100 mL de agua destilada

SOLUCIÓN 3

Tiamina	7,0
Biotina	1,0
B_{12}	0,6

Nota: disolver la tiamina en 98 mL de agua ácida (pH 4,5-5). Adicionar otras vitaminas (Biotina y B_{12})

SOLUCIÓN 4

NaNO_3	2000	34,000
NaH_2PO_4	100	2,400

Nota: disolver en 600 mL de agua destilada.

Las soluciones deberán ser autoclavadas y mezcladas en frío quedando las soluciones mezcladas en un volumen final de 1 Litro.

** 10 mL de solución stock se adicionarán a 1L de agua de mar autoclavada para quedar una concentración de NaNO_3 en 4 mM.

Capítulo 5: Reformulación del **Medio de Cultivo "ALGAL"** (Fábregas *et al.*, 1984) por la incorporación en conjunto de los elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en concentraciones óptimas.

Tabla 2: ALGAL ALTO RENDIMIENTO 4 mM**

Phaeodactylum tricornutum

Modificado de Fábregas, J., Abalde, J., Herrero C., Cabezas, B., and Veiga, M. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. **Aquaculture** 42: 207-215.

SOLUCIÓN 1

Macro/microelementos	Concentración μM	Cantidad mg/L
ZnCl_2	0,1	2,73
$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	39,58
$\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,0	48,39
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1	4,76
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0	49,30
CaCl_2	1,0	22,20
CuSO_4	0,1	3,17
SiO_2	1,0	12,02
SeO_2	1,0	22,19
Na_2SO_4	0,1	2,84
EDTA		514,0

Nota: disolver en 200 mL de agua destilada

SOLUCIÓN 2

$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	20	1051,88
---	----	---------

Nota: disolver en 100 mL de agua destilada

SOLUCIÓN 3

Tiamina	7,0
Biotina	1,0
B_{12}	0,6

Nota: disolver la tiamina en 98 mL de agua acida (pH 4,5-5). Adicionar otras vitaminas (Biotina y B_{12})

SOLUCIÓN 4

NaNO_3	2000	34,000
NaH_2PO_4	100	2,400

Nota: disolver en 600 mL de agua destilada.

Las soluciones deberán ser autoclavadas y mezcladas en frío quedando las soluciones mezcladas en un volumen final de 1 Litro.

** 10 mL de solución stock se adicionarán a 1L de agua de mar autoclavada para quedar una concentración de NaNO_3 en 4 mM.

Capítulo 5: Reformulación del **Medio de Cultivo "ALGAL"** (Fábregas *et al.*, 1984) por la incorporación en conjunto de los elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en concentraciones óptimas.

Tabla 3: ALGAL ALTO RENDIMIENTO 4 mM**

***Isochrysis galbana* Parke var. T-iso**

Modificado de Fábregas, J., Abalde, J., Herrero C., Cabezas, B., and Veiga, M. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. **Aquaculture** 42: 207-215.

SOLUCIÓN 1

Macro/microelementos	Concentración μM	Cantidad mg/L
ZnCl_2	1,0	27,26
$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	39,58
$\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,0	48,39
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1	4,76
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,0	492,96
CaCl_2	10,0	221,98
CuSO_4	1,0	31,72
SiO_2	1,0	12,02
SeO_2	1,0	22,19
Na_2SO_4	0,1	2,84
EDTA		3063,0

Nota: disolver en 200 mL de agua destilada

SOLUCIÓN 2

$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	20	1051,88
---	----	---------

Nota: disolver en 100 mL de agua destilada

SOLUCIÓN 3

Tiamina	7,0
Biotina	1,0
B_{12}	0,6

Nota: disolver la tiamina en 98 mL de agua acida (pH 4,5-5). Adicionar otras vitaminas (Biotina y B_{12})

SOLUCIÓN 4

NaNO_3	2000	34,000
NaH_2PO_4	100	2,400

Nota: disolver en 600 mL de agua destilada.

Las soluciones deberán ser autoclavadas y mezcladas en frío quedando las soluciones mezcladas en un volumen final de 1 Litro.

****** 10 mL de solución stock se adicionarán a 1L de agua de mar autoclavada para quedar una concentración de NaNO_3 en 4 mM.

Tabla 4: ALGAL INCREMENTO CANTIDAD EPA 4 mM**

Phaeodactylum tricornutum

Modificado de Fábregas, J., Abalde, J., Herrero C., Cabezas, B., and Veiga, M. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture* 42: 207-215.

SOLUCIÓN 1

Macro/microelementos	Concentración μM	Cantidad mg/L
ZnCl_2	0,1	2,73
$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	39,58
$\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,0	48,39
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1	4,76
CuSO_4	0,1	3,17
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0	49,30
CaCl_2	1,0	22,20
SiO_2	1,0	12,02
SeO_2	0,1	2,22
Na_2SO_4	1,0	28,41
EDTA		748,0

Nota: disolver en 200 mL de agua destilada

SOLUCIÓN 2

$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	20	1051,88
---	----	---------

Nota: disolver en 100 mL de agua destilada

SOLUCIÓN 3

Tiamina	7,0
Biotina	1,0
B_{12}	0,6

Nota: disolver la tiamina en 98 mL de agua acida (pH 4,5-5). Adicionar otras vitaminas (Biotina y B_{12})

SOLUCIÓN 4

NaNO_3	2000	34,000
NaH_2PO_4	100	2,400

Nota: disolver en 600 mL de agua destilada.

Las soluciones deberán ser autoclavadas y mezcladas en frío quedando las soluciones mezcladas en un volumen final de 1 Litro.

** 10 mL de solución stock se adicionarán a 1L de agua de mar autoclavada para quedar una concentración de NaNO_3 en 4 mM.

Capítulo 5: Reformulación del **Medio de Cultivo "ALGAL"** (Fábregas *et al.*, 1984) por la incorporación en conjunto de los elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en concentraciones óptimas.

Tabla 5: ALGAL INCREMENTO CANTIDAD DHA 4 mM**

***Isochrysis galbana* Parke var. T-iso**

Modificado de Fábregas, J., Abalde, J., Herrero C., Cabezas, B., and Veiga, M. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. **Aquaculture** 42: 207-215.

SOLUCIÓN 1

Macro/microelementos	Concentración μM	Cantidad mg/L
ZnCl_2	1,0	27,26
$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	39,58
$\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,0	48,39
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1	4,76
CuSO_4	1,0	31,72
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0	49,30
CaCl_2	1,0	22,20
SiO_2	1,0	12,02
SeO_2	0,1	2,22
Na_2SO_4	1,0	28,41
EDTA		959,0

Nota: disolver en 200 mL de agua destilada

SOLUCIÓN 2

$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	20	1051,88
---	----	---------

Nota: disolver en 100 mL de agua destilada

SOLUCIÓN 3

Tiamina	7,0
Biotina	1,0
B_{12}	0,6

Nota: disolver la tiamina en 98 mL de agua acida (pH 4,5-5). Adicionar otras vitaminas (Biotina y B_{12})

SOLUCIÓN 4

NaNO_3	2000	34,000
NaH_2PO_4	100	2,400

Nota: disolver en 600 mL de agua destilada.

Las soluciones deberán ser autoclavadas y mezcladas en frío quedando las soluciones mezcladas en un volumen final de 1 Litro.

****** 10 mL de solución stock se adicionarán a 1L de agua de mar autoclavada para quedar una concentración de NaNO_3 en 4 mM.

Tabla 6. Concentración media típica de los componentes del agua de mar.

	Elemento	Concentración media Molar (rango)
Grupo 1		
	Na^+	$4,7 \times 10^{-1}$
	K^+	$1,02 \times 10^{-2}$
	Mg^{2+}	$5,3 \times 10^{-2}$
	Ca^{2+}	$1,03 \times 10^{-2}$
	Cl^-	$5,5 \times 10^{-1}$
	SO_4^{2-}	$2,8 \times 10^{-2}$
	HCO_3^-	$2,3 \times 10^{-3}$
	BO_3^{3-}	$4,2 \times 10^{-4}$
Grupo 2		
	Br^-	$8,4 \times 10^{-4}$
	F^-	$6,8 \times 10^{-5}$
	IO_3^-	$4,4 \times 10^{-7}$
	Li^+	$2,5 \times 10^{-5}$
	Rb^+	$1,4 \times 10^{-6}$
	Sr^{2+}	$8,7 \times 10^{-5}$
	Ba^{2+}	1×10^{-7}
	MoO_4^{2-}	$1,1 \times 10^{-7}$
	VO_4^{3-}	$2,3 \times 10^{-8}$
	CrO_4^{2-}	4×10^{-9}
	AsO_4^{3-}	$2,3 \times 10^{-8}$
	SeO_4^{2-}	$1,7 \times 10^{-9}$
Grupo 3		
	NO_3^-	$3 \times 10^{-5} (10^{-8} \text{ a } 4,5 \times 10^{-5})$
	PO_4^{3-}	$2,3 \times 10^{-6} (10^{-7} \text{ a } 3,5 \times 10^{-6})$
	Fe^{3+}	$1 \times 10^{-9} (10^{-10} \text{ a } 10^{-7})$
	Zn^{2+}	$6 \times 10^{-9} (5 \times 10^{-11} \text{ a } 10^{-7})$
	Mn^{2+}	$5 \times 10^{-10} (2 \times 10^{-10} \text{ a } 10^{-6})$
	Cu^{2+}	$4 \times 10^{-9} (5 \times 10^{-10} \text{ a } 6 \times 10^{-9})$
	Co^{2+}	$2 \times 10^{-11} (10^{-11} \text{ a } 10^{-10})$
	SiO_4^{4-}	$1 \times 10^{-4} (10^{-7} \text{ a } 1,8 \times 10^{-4})$
	Ni^{2+}	$8 \times 10^{-9} (2 \times 10^{-9} \text{ a } 1,2 \times 10^{-8})$

Tabla tomada de Barsanti and Gualtieri, 2006

Capítulo 6

Evaluación del efecto de los medios de cultivo ***Algal Alta Rendimiento (AAR)*** y ***Algal Incremento Concentración DHA (ADHA)*** en diferentes concentraciones de nitrógeno, sobre la generación de biomasa, composición bioquímica, e incorporación elemental de ***Isochrysis galbana*** var. **T-iso**, en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.

Introducción

Se ha prestado poca atención a los efectos de la absorción de metales en diversos organismos marinos. Muchos metales bioactivos, son elementos esenciales como nutrientes para el crecimiento microalgal, tal y como se ha demostrado en los capítulos 1 y 2 de la presente disertación, así como, además jugar un papel importante en la regulación de la sucesión de la productividad primaria en comunidades fitoplactónicas (Hudson, 1998; Sunda and Huntsman, 1998). Como resultado recientemente se está prestando atención a la investigación sobre la interacción de varios elementos en el crecimiento microalgal (Braek *et al.*, 1980; Currie *et al.*, 1998; Rijstenbil *et al.*, 1998; Lee and Luoma, 1998b; Hong *et al.*, 2009). Algunos estudios han demostrado que diferencias en la concentración de los macro y micronutrientes afectan la absorción de los elementos por las microalgas y su posterior transferencia a lo largo de la cadena trófica (Lee and Wang, 2001; Wang and Dei, 2001a, b, c; Wang *et al.*, 2007).

Es en base a lo anteriormente descrito que se plantea importante la manipulación de la nutrición mineral en las microalgas como base de la cadena trófica siendo una herramienta importante ya que influye en la calidad bioquímica de estas (Mandalam-Ramkumar and Palsson-Bernhard 1998); ahora bien es importante respondernos si la concentración de diferentes macro y microelementos en conjunto influyen en la productividad y calidad bioquímica de las microalgas dada la reconstitución del medio de cultivo "ALGAL INDUSTRIAL" (Fábregas *et al.*, 1984).

Diseño experimental

Se utilizó a la microalga *Isochrysis galbana* (var. T-iso, CCMP 1324) para cultivarla en régimen discontinuo y semicontinuo en minifotobiorreactores cilindro cónicos con 80 mL de volumen de cultivo; empleando y comparando los siguientes medios de cultivo: "Algal Industrial" (**AITISO=ALGAL**) (Fábregas *et al.*, 1984), **Algal Alto Rendimiento (AARTISO)** (desarrollado en el capítulo 5, en base a los resultados del capítulo 2) ambos con una concentración de nutrientes 4 mg át. N.L⁻¹ en forma de NaNO₃, así como el medio denominado "Algal Incremento de la Cantidad DHA" (**ADHA**) (desarrollado en el capítulo 5, en base a los resultados del capítulo 2) con una concentración de nutrientes 4, 8 y 16 mg át. N.L⁻¹ en forma de NaNO₃. Las condiciones de cultivo se especifican en la sección de Materiales y Métodos. Los cultivos ($n=5$) se sometieron a una tasa de renovación del 30%. Se empleó una densidad inicial de $5,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹. Los cultivos se dejaron llegar hasta el final de la fase logarítmica. Se consideró que alcanzó la fase estacionaria cuando la densidad celular en cultivo se mantuvo constante durante tres días consecutivos como mínimo, finalizando el cultivo discontinuo, evalúese la biomasa generada y cosechese de 5 a 10 mL de biomasa microalgal por centrifugación, para el análisis correspondiente de proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, incorporación de metales; y filtración de biomasa microalgal, para determinación de peso seco, cenizas y materia orgánica por célula de *Isochrysis galbana* var. T-iso, en base a las técnicas descritas en la sección de Materiales y Métodos.

Resultados y discusión.

La densidad celular de *Isochrysis galbana* var. T-iso ($10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$), cultivada con los diferentes medios de cultivo y concentraciones ya citadas, una vez que llegaron al final de la fase estacionaria de crecimiento, mostraron los siguientes valores de biomasa celular en estado de equilibrio al día 10 (T_{10}) de cultivo discontinuo (CD): **AITISO4**($70,40 \pm 7,61$), **AARTISO4**($83,75 \pm 5,98$), **ADHA4**($84,40 \pm 6,90$), **ADHA8**($140,25 \pm 13,89$), **ADHA16**($162,25 \pm 13,89$), ver figura 1a; indicándonos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo mencionadas ($p<0,05$) (figura 1b). Observándose además que el incremento de la concentración de nutrientes en el medio de cultivo **ADHA** mostró una correlación r^2 de 0,94 con ajuste a una tendencia lineal positiva en la generación de biomasa (figura 1c). Otero, 1994 con la especie *Isochrysis galbana* Parke empleando el medio de cultivo "ALGAL" con una concentración de nutrientes 2 y 4mM solo llegó a obtener densidades de $25,58$ y $45,74 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$ respectivamente. Por otra parte Fábregas *et al.*, 1986b en cultivos masivos de 10 L en fase estacionaria con concentración de nutrientes 2 y 4 mM obtiene densidades inferiores a las del presente estudio en torno a $53,8$ y $65,5 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$. Nuestros resultados indican que la complejidad en ingredientes de los nuevos medios de cultivo concebidos a partir del medio "ALGAL" son eficaces en mejorar el rendimiento de productividad celular y que además no existe fotoinhibición, que limite el crecimiento celular. Ferreira, 2006 cultivando con "ALGAL" a *Isochrysis galbana* var. T-iso, con presencia ausencia de CO_2 y diferentes intensidades lumínicas, obtiene solo valores de $60,41$ - $61,25 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$.

Se obtuvieron tasas máximas de crecimiento de: 1,96, 2,10, 2,54, 2,37 y 2,31 div. día^{-1} para **AITISO4**, **AARTISO4**, **ADHA4**, **ADHA8** y **ADHA16** respectivamente (tabla 1).

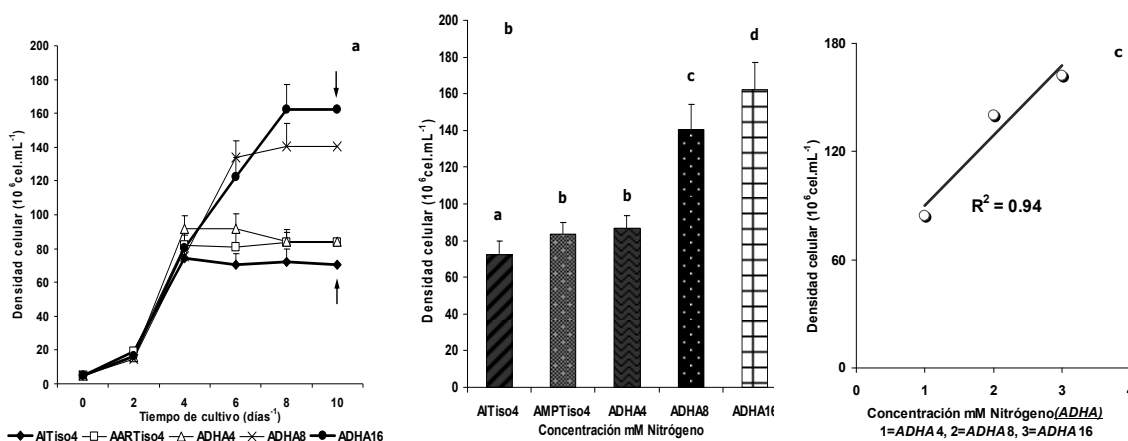


Figura 1.- Densidad celular *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo discontinuo con diferentes medios de cultivo. Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

La densidad celular de estabilización en cultivo semicontinuo (CS) ($10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$) respecto al cultivo discontinuo (CD) para cada medio de cultivo probado, mostró diferencias con la tasa de renovación del 30%, de modo que medios como el **AITISO4**, **ADHA8** y **ADHA16** decrecieron su concentración un 28 ($51,85 \pm 8,59$), 22 ($107,55 \pm 10,10$) y 65%

(57,08±4,74) respectivamente, en tanto que las recetas **AARTISO4**, **ADHA4** incluso incrementaron su concentración celular un 11 (94,72±4,31) y 6% (91,85±8,30) comparativamente (*figura 2a*), alcanzando el estado de equilibrio al día 32 de cultivo; existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo ($p<0,05$) (*figura 2a*). Ferreira, 2006, con el medio de cultivo **ALGAL=AITISO4** y diferentes intensidades lumínicas con una tasa de renovación del 30% obtuvo densidades en CS de 56,13-60,56x10⁶cel.mL⁻¹, sin embargo Otero, 1994 con *Isochrysis galbana* Parke en las condiciones antes descritas obtiene 27,26-35,21x10⁶cel.mL⁻¹.

El incremento de la concentración de nutrientes en el medio de cultivo **ADHA** mostró una fuerte correlación r^2 de 1 con ajuste a una tendencia polinomial negativa, en la generación de biomasa (*figura 2b*) en cultivo semicontinuo.

La interacción de los diferentes medios de cultivo en *Isochrysis galbana* var. T-iso mostró una productividad celular (10⁹cel.L⁻¹.día⁻¹) de 15,5(**AITISO4**), 28,42(**AARTISO4**), 27,55(**ADHA4**), 32,26(**ADHA8**) y 17,12(**ADHA16**) (ver *figura 2c*). Productividades que fueron superiores a las reportadas por Otero, 1994 con *Isochrysis galbana* Parke con 10,8x10⁹cel.L⁻¹.día⁻¹ empleado el medio de cultivo "ALGAL" con una concentración de nutrientes 4mM y una tasa de renovación 30-40%. Así mismo Burgess *et al.*,1993 obtiene productividades similares al anterior autor pero con *Isochrysis galbana* var. T-iso. Otros autores como Laing and Jones 1983, 1988 con *Isochrysis galbana* var. T-iso en sistemas de cultivo en turbidostato de 40 y 80 L solo obtienen productividades de 12,95 y 15-17x10⁹cel.L⁻¹.día⁻¹, Ferreira, 2006 en CS con el medio "ALGAL" y diferentes intensidades de luz, indica valores de 16,84-18,17x10⁹cel.L⁻¹.día⁻¹, así mismo Laing, 1985 en cultivos de largo plazo obtiene solo 6,5x10⁹cel.L⁻¹.día⁻¹. Cultivos masivos efectuados con la misma microalga que el presente estudio pero con una formulación de nutrientes 2mM rindieron productividades menores con 1,5x10⁹cel.L⁻¹.día⁻¹ con el medio de cultivo "ALGAL" a una tasa de renovación del 30% (Herrero *et al.*,1991). Quaid and Richmond, 1993, mencionan que el limite máximo de productividad descrito bajo condiciones óptimas en las que no existe limitación por nutrientes ni luz es con una tasa de renovación del 30%.

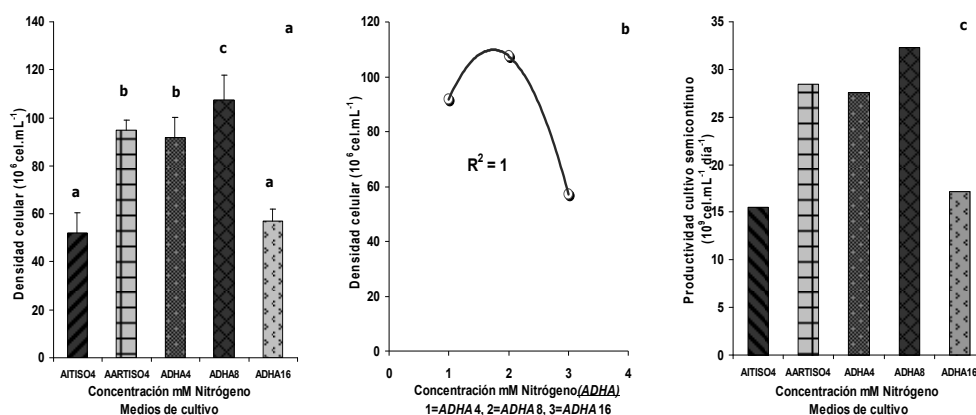


Figura 2.- (a)Máxima densidad celular en cultivo semicontinuo para *Isochrysis galbana* var. T-iso con diferentes medios de cultivo, **(b)** Correlación ADHA4,8,16 mM **(c)** Productividad. Media ± SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existen diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

Se cuantifico la cantidad de nitrógeno residual (mM), al final de la etapa de estabilización de los cultivos en semicontinuo, mostrándose valores de 0,83(**AITISO4**), 0,23(**AARTISO4**), 0,25(**ADHA4**), 0,31(**ADHA8**), 0,50(**ADHA16**) ver *tabla 1*. La fluctuación del nitrógeno (N) residual entre las concentraciones de los medios de cultivo, correspondió con la densidad celular generada (*tablas 1*), es decir a mayor densidad celular menor cantidad de nitrógeno residual o mejor dicho conversión de nitrato en nitrógeno intracelular (Otero, 1994, Otero *et al.*,1998).

Se observaron los siguientes valores de cuota celular de nitrógeno Q_N y carbono Q_C (pg.cel^{-1}), para *Isochrysis galbana* var. T-iso con los diferentes medios de cultivo probados **AITISO4** (0,49-3,32), **AARTISO4** (1,08-12,99), **ADHA4** (0,63-8,16), **ADHA8** (0,93-7,18), **ADHA16** (1,68-9,77) (*tabla 1 y figura 3*) valores que nos indicaron la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las concentraciones de cultivo ($p<0,05$) para ambas cuotas celulares, uno y otro valores como se puede observar para los nuevos medios de cultivo probados, son superiores al medio control (**AITISO4=ALGAL**), base sobre el cual fueron concebidas las nuevas recetas de cultivo. Los valores de Q_N y Q_C reportados en este estudio son inferiores a los reportados por Otero, 1994 con *Isochrysis galbana* Parke a una tasa de renovación del 30% en cultivos en ciclostato (1,71 y 12,01 pg.cel^{-1} respectivamente), excepto para la microalga cultivada con el medio de cultivo **AARTISO4** (1,08-12,99). Mientras que Ferreira, 2006 en *Isochrysis galbana* var. T-iso con tasa de renovación del 30% y 4mM de nutrientes (ALGAL) obtuvo una Q_N y Q_C de 0,71 y 6,42 pg.cel^{-1} comparativamente, valores por debajo de los aquí reportados (*tabla 1*).

Obtuvo se la siguiente relación C:N para la microalga cultivada con los diferentes medios de cultivo **AITISO4** (5,78), **AARTISO4** (10,28), **ADHA4** (11,05), **ADHA8** (6,64), **ADHA16** (4,98) (*tabla 1 y figura 3*) resultados que nos revelaron la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo ($p<0,05$). Destacar que tal relación en el medio de cultivo denominado **ADHA** en las concentraciones 4, 8 y 16mM de nutrientes, no mostró una evolución lineal positiva y si negativa (*tabla 1*) como podría esperarse dada la concentración de nutrientes, como también no sucedió con la tasa máxima de crecimiento (*tabla 1*) reflejo de la densidad celular en CS; así mismo la conversión de nitrógeno en el medio, en nitrógeno intracelular es alta dados los valores de nitrógeno residual antes reportados (*tabla 1*); lo que apoyaría la hipótesis de que el nitrógeno no es el único de los nutrientes que limita o coadyuva el crecimiento celular en cultivo semicontinuo (Laws and Bannister, 1980) con las formulaciones **AARTISO4, ADHA4, ADHA8 y ADHA16**, existiendo por lo tanto interacción entre la complejidad de los nutrientes presentes.

Los valores de C:N para *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con **AARTISO4** (10,28) y **ADHA4** (11,05) son mayores a los reportados por Otero, 1994 con *Isochrysis galbana* Parke en cultivos en ciclostato, donde a una tasa de renovación del 30% igual a la del presente estudio, demostró una relación de solo 8,19. En tanto Ferreira, 2006 con *Isochrysis galbana* var. T-iso con diferentes intensidades de luz y una tasa de renovación del 30% halla solo un valor de C:N entre 8,6-10,6. La relación C:N descrita por otros autores para *Isochrysis galbana* Parke varía desde 6,04 en fase logarítmica hasta 18,72 en fase estacionaria tardía (Fernandez Reiriz *et al.*,1989), aunque en cultivo continuo con tasas de

crecimiento elevadas y sin limitación por nutrientes ni luz, esta relación es próxima a 6 (Falkowski *et al.*, 1985). Los valores descritos en el presente estudio (*tabla 1*) con excepción de la condición **AITISO4** (5,78) y **ADHA16** (4,98), son mayores en el rango de 11,05-6,64, a los reportados por Osborne and Geider, 1986, con respecto a la relación Redfield (C:N 6,6), valores con los cuales se considera, no existe limitación por nutrientes (Goldman *et al.*, 1979; Goldman and Peavey, 1979, Goldman *et al.*, 1986) lo que nos indicaría además la proximidad de la máxima tasa de crecimiento (McCarthy, 1980) ver *tabla 1*; sin embargo un exceso aun mayor de nutrientes influye sobre una disminución de tal relación como ocurrió con la condición **ADHA16** (4,98) (*figura 3*). Parsons *et al.*, 1961, en cultivos discontinuos obtiene valores de C:N=7,5; en tanto que Sukenik and Wahnnon, 1991 reportan con *Isochrysis galbana* var. T-iso una relación C:N de 9,4 en cultivos en turbidostato sin limitación de nutrientes. Los valores de C:N dependerán por tanto de las condiciones de saturación por nitrógeno, la complejidad y concentración optima de los elementos que constituyen a cada uno de los nuevos medios de cultivo probados en cultivos en semicontinuo, con regimenes de iluminación circadiana (12:12h luz:oscuridad) (Otero *et al.*, 1998).

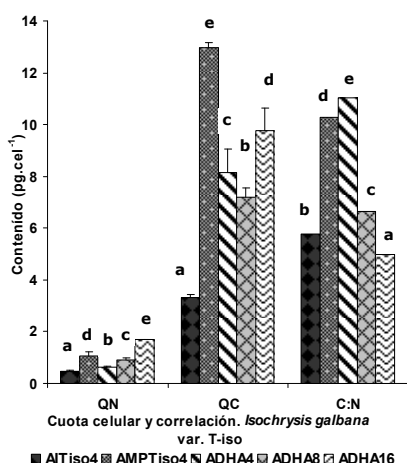


Figura 3.- Cuota celular de nitrógeno Q_N , carbono Q_C y relación C:N respecto a los diferentes medios de cultivo en *I. galbana* var. T-iso. Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

La composición bioquímica celular (proteínas, carbohidratos y lípidos) de *Isochrysis galbana* var. T-iso, vario ampliamente con respecto a los medios de cultivo empleados y concentración [mM] de estos, existiendo en el comportamiento de los tres combustibles bioquímicos, diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo ($p<0,05$) (*tabla 1* y *figura 4a*). Por lo que respecta al medio de cultivo **ADHA** en las concentraciones de nutrientes 4, 8 y 16 mM la evolución del contenido de proteína mostró un coeficiente de correlación r^2 de 0,92 (con tendencia lineal positiva), derivado de Q_N (*tablas 1*), en tanto que con respecto a los carbohidratos un $r^2=0,85$ (con ajuste a una tendencia negativa) derivado de Q_C , y en el caso de los lípidos un r^2 de 0,91 (con ajuste a una tendencia positiva) (*figuras 4b*).

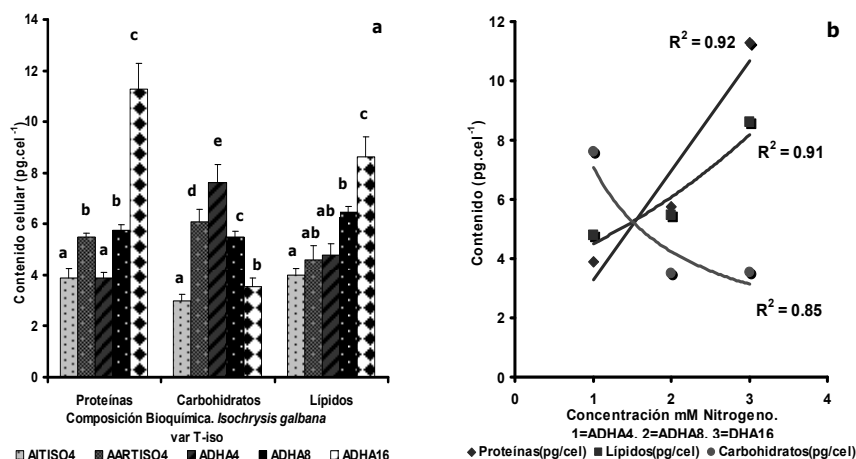


Figura 4. (a) Contenido celular (pg.cel⁻¹) de proteínas, carbohidratos y lípidos, respecto a los diferentes medios de cultivo en *I. galbana* var. T-iso. **(b)** Coeficientes de correlación **ADHA4,8,16**. Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

Los registros de contenido proteico celular en cultivo semicontinuo dependieron de las formulaciones probadas; los cuales oscilaron entre 3,90 y 11,28 pg.cel⁻¹ (tabla 1 y figura 4a) donde las recetas **AARTISO4**(5,50), **ADHA4**(3,90), **ADHA8**(5,75), y **ADHA16**(11,28) mostraron un mejor rendimiento proteico celular con respecto al medio **AITISO4=ALGAL**(3,87). Observándose además, que la formulación **ADHA** conforme incrementa su concentración de nutrientes incrementa tal rendimiento proteico. Utting, 1985; Brown, 1993a obtienen para *Isochrysis galbana* un valor máximo de contenido celular en proteína de 12 pg.cel⁻¹ con relaciones muy elevadas de nitrógeno en el medio por célula. Dichos valores son superiores a los reportados por Ferreira, 2006; Ferreira *et al.*,2008 en el rango de 3,48-6,06 pg.cel⁻¹ en estudios realizados con presencia, ausencia de CO₂ y diferentes tasas de iluminación en *Isochrysis galbana* var. T-iso con una tasa de renovación del 30%, con el medio de cultivo "ALGAL" (Fábregas *et al.*,1984). Brown, 1991 utilizando la misma especie de microalga, en cultivo discontinuo reportó un valor proteico de 6,8 pg.cel⁻¹. En tanto que Valenzuela-Espinoza *et al.*,2002 en cultivos discontinuos logró un contenido proteico con diferentes medios de cultivo entre 7,33 y 7,64 pg.cel⁻¹, valores que superan a los descritos con los medios de cultivo **AITISO4**(3,87), **AARTISO4**(5,50), **ADHA4**(3,90), **ADHA8**(5,75), excepto con el medio de cultivo **ADHA16**(11,28). Sin embargo Sukenik and Wahnnon, 1991 describen valores máximos de contenido celular de proteína con tasa máximas de división celular, alrededor de 5-7 pg.cel⁻¹, en tanto Herzing and Falkowski, 1989 indica un valor de 9,3 pg.cel⁻¹ con bajos niveles de nitrógeno utilizados. Indicar que en el capítulo 2 de la presente disertación, una vez deducidas las concentraciones optimas por separado, de los elementos Ca²⁺, Mg²⁺, Se²⁻, Si⁴⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, y S²⁻, en la reconstitución parcial del medio "ALGAL" y con las cuales solo se obtuvo un rendimiento de proteína en el rango de 2,17-5,93 pg.cel⁻¹, rango inferior al obtenido cultivando a *Isochrysis galbana* var. T-iso con los nuevos medios **AARTISO4**, **ADHA4**, **ADHA8** y **ADHA16**. Piorreck and Phol, 1984; Kaixian and Borowitzka, 1992; Fernández Sevilla, 1995, mencionan que

tiempos de residencia cortos de nutrientes y en suma su importancia fisiológica es que promoverán la formación de proteínas, combustible rápidamente empleado en el crecimiento y división celular por lo que es de esperarse los valores de este estudio en cultivo semicontinuo, en adición a la complejidad y concentración de los elementos, que dependiendo de esta, poseerán una amplia implicación en la síntesis de proteínas como mencionan varios autores (O'Kelley, 1974; McCarthy, 1980; Kaplan *et al.*, 1990).

El contenido de carbohidratos celulares dependió de la receta de cultivo empleada, fluctuando entre 2,98 y 7,62 pg.cel⁻¹ (tabla 1) donde las recetas de cultivo **AARTISO4**(6,07), **ADHA4**(7,62), **ADHA8**(5,49), y **ADHA16**(3,55) mostraron un mejor rendimiento en carbohidratos celulares con respecto a la formulación **AITISO4=ALGAL**(2,98). Indicar que el incremento de nutrientes con el medio de cultivo **ADHA** hizo decrecer la cantidad de dicho combustible celular. Prestar atención que en el rendimiento de CHOs descrito para los elementos Ca²⁺, Mg²⁺, Se²⁻, Si⁴⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, y S²⁻ en la reconstitución parcial del medio "ALGAL" (capítulo 2), nos indico un rango entre 2,17 y 4,70 pg.cel⁻¹ que es inferior al obtenido cultivando a la microalga con los nuevos medios **AARTISO4, ADHA4, ADHA8 y ADHA16**. Los valores de CHOs descritos con la mayoría de los medios probados en el presente estudio, superan los rendimientos reportados por Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002 con diferentes medios de cultivo con 3,8 y 4,0 pg.cel⁻¹, en tanto que Fernández Reiríz *et al.*, 1989 halla valores muy bajos de solo 1,80 pg.cel⁻¹. Por otra parte Ferreira, 2006; Ferreira *et al.*, 2008 con una tasa de renovación del 30% y diferentes intensidades de luz y el medio de cultivo "ALGAL" manifiesta valores en el rango de 2,71-3,92 pg.cel⁻¹.

En continuación, el contenido lipídico celular demostró con respecto a los medios de cultivo probados, valores en el rango de 4,59 y 8,62 pg.cel⁻¹; donde las recetas de cultivo **AARTISO4**(4,59), **ADHA4**(4,77), **ADHA8**(6,45), y **ADHA16**(8,62) revelaron un mejor rendimiento lipídico celular con respecto al medio **AITISO4=ALGAL**(4,00). Decir que el incremento de nutrientes con la receta de cultivo **ADHA** (4, 8, y 16mM), aumentó la cantidad de dicho combustible celular. Mencionar que en el capítulo 2 de la presente disertación se observó una oscilación en el rendimiento lipídico celular de 1,69-4,28 pg.cel⁻¹ con respecto a los elementos Ca²⁺, Mg²⁺, Se²⁻, Si⁴⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, y S²⁻, rango que es inferior al obtenido cultivando a la microalga con las nuevas fórmulas antes mencionadas. Valores que se encuentran por arriba de los reportados por Fernández Reiríz *et al.*, 1989 con 5,90 pg.cel⁻¹ así como los 4,81 pg.cel⁻¹ logrados por Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002. Ferreira, 2006; Ferreira *et al.*, 2008 con una tasa de renovación del 30% y diferentes intensidades de luz y el medio de cultivo "ALGAL" señala valores en el rango de 4,23-6,24 pg.cel⁻¹.

Otero, 1994 en sus estudios sobre la modificación de la composición bioquímica de *Isochrysis galbana* Parke, en régimen de ciclostato menciona que, elevadas tasas de crecimiento (con renovación del 30 ó 40%) y con concentraciones de nutrientes (N) 4 mM con el medio de cultivo "ALGAL", son eficientes para la obtención de biomasa de elevado valor nutritivo con 9,92 pg.cel⁻¹ de proteínas, 3,17 pg.cel⁻¹ de carbohidratos y 2,5 pg.cel⁻¹ de

lípidos con un peso orgánico de 15,59 pg.cel⁻¹, valores nutricionales que fueron mejorados en el presente estudio con los medios de cultivo **AARTISO4, ADHA4, ADHA8 y ADHA16** en el rango de 16,16-23,45 pg.cel⁻¹ de peso orgánico (*tabla 1*).

Los resultados del presente estudio sugieren que cambios en la composición bioquímica celular, fueron influenciados por las nuevas formulaciones ya descritas (capítulo 5), así como la concentración óptima de Ca²⁺, Mg²⁺, Se²⁻, Si⁴⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, y S²⁻ en la reconstitución del medio de cultivo “Algal” (Fábregas *et al.*,1984) (capítulo 2). Los carbohidratos han demostrado ser la reserva energética intermedia en algunas microalgas, debido a que son necesarios cuando la fuente de nitrógeno se ve limitada en la síntesis de lípidos.

Ferreira, 2006 menciona que las microalgas del género *Isochrysis* acumulan los dos tipos de productos de reserva, pero la predominancia de carbohidratos o lípidos parece depender de las condiciones de cultivo mas que de la especie, así como por la complejidad de los medios de cultivo probados en el presente estudio; lo que nos da una idea de la versatilidad de la actividad metabólica celular vía la concentración de ciertos elementos en conjunto, los cuales poseen acusada implicación en la síntesis de proteínas, lípidos y carbohidratos, además de otros metabolitos intermedios (O’Kelley, 1974; McCarthy, 1980; Kaplan *et al.*,1990). Fernández Reiríz *et al.*,1989, menciona que en cultivos no continuos tanto lípidos como carbohidratos se incrementaran con la edad del cultivo, siendo más acusado el aumento de los carbohidratos y posibles responsables de la variación del peso orgánico en cultivos en fase estacionaria, tal y como fue evidente pero en cultivo semicontinuo con las recetas de cultivo **AITISO4, AARTISO4, ADHA4** (*tabla 1 y figura 4a*). Aunque en el presente estudio se observo con el nuevo medio de cultivo **ADHA** en concentración de nutrientes 4, 8, y 16 mM, que el contenido de carbohidratos decrece en función del incremento de nutrientes en cultivo semicontinuo.

Cuando el contenido de proteína se considera como porcentaje de la fracción orgánica (FO) este fluctuó entre el 23,96 y 48,07% (*tabla1 y figura 5*). Donde *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con los medios **AITISO4, AARTISO4** expresan valores muy cercanos en torno al 35%, en tanto que con el medio **ADHA** la FO se incremento linealmente del 23,96 al 48,07% dado un incremento en la concentración de nutrientes en el medio de cultivo. Por lo que respecta a la FO de los lípidos, esta mostró un rango de comportamiento del 28,41 al 37,11%; donde al igual que sucedió en la FO de las proteínas, la FO de los lípidos se incremento, en respuesta a la mayor adición de nutrientes en el medio de cultivo **ADHA**. En el caso de la FO de los carbohidratos existió marcada diferencia entre los medios **AITISO4, AARTISO4** con un 27,44 y 37,57% respectivamente; en tanto que dicha FO en el medio **ADHA** con un incremento de nutrientes tiende a disminuir en torno al 46,76-15,15%, dicha tendencia fue muy similar en el contenido pg.cel⁻¹ (*tabla 1*).

Es en base a la fracción orgánica que es más claro el comportamiento de los lípidos y carbohidratos en los medios de cultivo probados, corroborando lo mencionado por Fernández

Reiríz *et al.*, 1989, donde mencionan que es acusado el incremento de los carbohidratos con respecto a las otras dos fracciones y que en el presente estudio, se mostró en un punto óptimo a una concentración de nutrientes 4mM (*tabla 1*) en los medios **AARTISO4** y **ADHA4**, y posiblemente esta fracción sea la responsable de la variación del peso orgánico en cultivos en semicontinuo del presente estudio, sin embargo un incremento lineal en la concentración de nutrientes entre 8 y 16 mM produce un decremento de los CHOs.

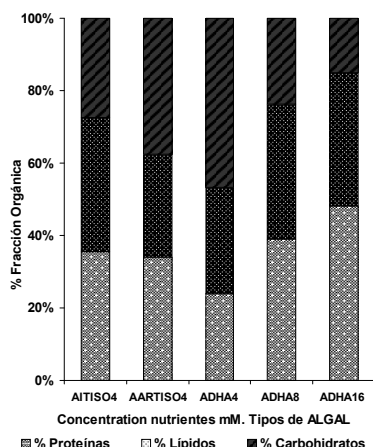


Figura 5.- Fracción orgánica de proteínas, lípidos y carbohidratos, en *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo con diferentes medios de cultivo.

Se obtuvieron diversos valores de contenido calórico celular, empleando los diferentes medios de cultivo, en el rango de $3,02$ y $6,73 \times 10^{-7}$ J.cél⁻¹, existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo ($p<0,05$) (*tabla 1*); donde las recetas **AARTISO4**, **ADHA4**, **ADHA8** y **ADHA16** en el rango de $4,17$ - $6,73 \times 10^{-7}$ J.cél⁻¹ mostraron generar un mayor contenido calórico celular con respecto al medio **AITISO4=ALGAL** ($3,02 \times 10^{-7}$ J.cél⁻¹) (*tabla 1*), por otra parte el medio de cultivo **ADHA** con diferente concentración de nutrientes, produjo en la biomasa celular un incremento lineal del contenido calórico lo cual se ve reflejado en el valor absoluto de peso orgánico (pg.cel⁻¹) (*tabla 1*). Los anteriores registros son superiores a los reportados por Ferreira, 2006 con $3,17$ - $3,84 \times 10^{-7}$ J.cél⁻¹ en su estudio sobre la optimización del valor nutritivo de *Isochrysis galbana* var. T-iso con diferentes intensidades de luz, tasa de renovación del 30% y empleando el medio de cultivo "ALGAL" en una concentración 4mM de nutrientes. Por otra parte Otero, 1994, empleando el medio de cultivo "ALGAL" en una concentración 2 y 4 mM obtiene solo contenidos calóricos en *Isochrysis galbana* Parke de $3,27$ y $3,90 \times 10^{-7}$ J.cél⁻¹ respectivamente, con una tasa de renovación del 30%. Los valores de contenido calórico obtenidos con los nuevos medios de cultivo incluso mostraron un mejor rendimiento, comparándolos con la inclusión por separado de Ca²⁺, Mg²⁺, Se²⁻, Si⁴⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, y S²⁻ en concentraciones óptimas en el medio de cultivo "ALGAL" (capítulo 2) con valores en el rango de $2,41$ - $3,32 \times 10^{-7}$ J.cél⁻¹. Sin duda la inclusión en conjunto de los anteriores elementos en concentraciones adecuadas en cada uno de los nuevos medios de cultivo diseñados (capítulo 5), respondió de diferente forma con las necesidades fisiológico celulares ya descritas por algunos autores (O'Kelley, 1974; McCarthy, 1980; Kaplan *et al.*, 1990). Whyte 1987, menciona que una gran variedad de especies microalgales poseerán un mayor contenido energético en fase estacionaria de crecimiento.

Existió un rango de variación en el peso seco celular en el orden de 12,82-30,06 pg.cel⁻¹ en base a los diferentes medios de cultivo probados en *Isochrysis galbana* var. T-iso (*tabla 1 y figura 6a*); tal oscilación se correspondió con la evolución de el peso orgánico (proteínas+carbohidratos+lípidos pg.cel⁻¹) en el rango de 10,85 y 23,45 pg.cel⁻¹; y por ende con el contenido de materia orgánica por célula (*tabla 1*), indicándonos la existencia en ambos casos de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$); donde las formulaciones **AARTISO4, ADHA4, ADHA8 y ADHA16** en el rango de 20,02-30,06 pg.cel⁻¹ mostraron generar un mayor peso seco celular con respecto al medio **AITISO4=ALGAL** con 12,82 pg.cel⁻¹. Observar además que el medio de cultivo **ADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8, 16mM) produjo en las células un incremento lineal del peso seco (*tabla 1 y figura 6a*) con un coeficiente de correlación lineal positivo r^2 de 0,91 (*figura 6b*).

En lo referente al contenido celular de cenizas como se puede observar en la *tabla 1 y figura 6a*, constaron diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre los diferentes medios de experimentación ($p<0,05$) donde las recetas de cultivo **AARTISO4, ADHA4, ADHA8 y ADHA16** incidieron en mostrar un mayor contenido celular de cenizas en el rango de 3,86-6,61 pg.cel⁻¹ con respecto al medio de cultivo **AITISO4=ALGAL** con 1,97 pg.cel⁻¹. Indicar que el contenido celular de cenizas con el medio de cultivo **ADHA** en concentración de nutrientes 4, 8 y 16mM reveló un comportamiento lineal, con un coeficiente de correlación positivo r^2 de 0,87 (*figura 6b*). La variable ceniza nos indica el tiempo de residencia de los elementos en la célula, vía el cultivo semicontinuo con un 30% de tasa de renovación, induciendo la acumulación de los elementos en el interior celular, con el fin de compensar la elevada presión osmótica del medio de cultivo que es rica en nutrientes minerales. Mencionar que en el capítulo 2 de la presente disertación independiente de la concentración de los elementos Ca²⁺, Mg²⁺, Se²⁻, Si⁴⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, y S²⁻, incluidos por separado en el medio de cultivo "ALGAL" (capítulo 2) se demostró un rango de contenido celular de cenizas entre un 1,04 y 3,44 pg.cel⁻¹, valores que se encuentran por debajo de los 3,86-6,61 pg.cel⁻¹ logrados con los nuevos medios de cultivo, lo que nos indicaría que además de la compensación por presión osmótica de los elementos intracelularmente, el transporte es aun más activo cuando estos elementos son nutricionalmente esenciales y forman complejos, un tipo de sinergismo entre elementos con nutrientes orgánicos como aminoácidos o proteínas y lípidos (Cid, 1993), lo cual se logro, debido a la nueva complejidad de ingredientes lo que coadyuvo a una mayor acumulación de cenizas en la célula.

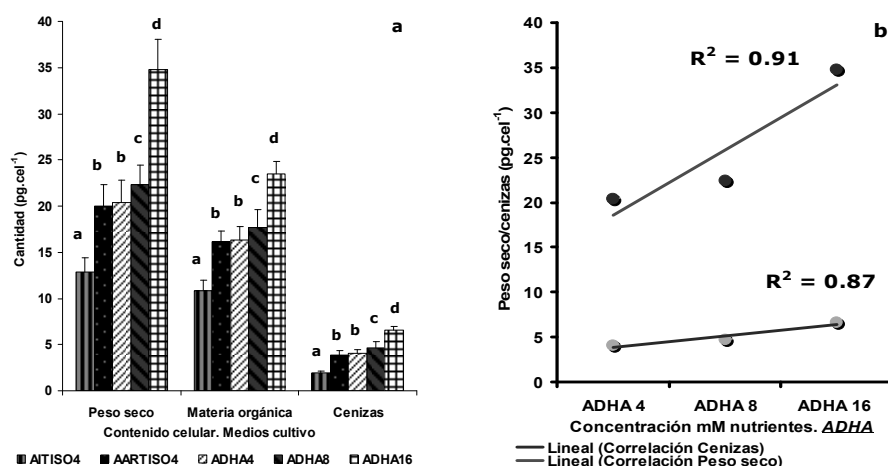


Figura 6.- (a) Contenido celular: peso seco, materia orgánica y cenizas (pg.cel⁻¹) en *Isochrysis galbana* var T-iso en cultivo semicontinuo con respecto a los diferentes medios de cultivo. **(b)** Correlación concentración nutrientes medio de cultivo **ADHA**. Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

Estudios realizados sobre la influencia en la concentración de nutrientes y la tasa de crecimiento sobre el contenido de cenizas contribuyen a poca información clarificadora sobre si un incremento del contenido celular en cenizas podría ser responsable de un descenso en Q_N en condiciones no limitantes (Otero, 1994), siendo que en nuestro estudio fue completamente al contrario ya que Q_N se incremento en respuesta al incremento de las cenizas (tablas 1). Sin embargo algunos autores (Fernández Reiríz *et al.*, 1989) en cultivos masivos han descrito un mayor contenido de cenizas en la fase exponencial de crecimiento que en fase estacionaria, otros más (Thomas *et al.*, 1984; Whyte 1987) no encuentran una tendencia definitiva de la presencia de cenizas con la concentración de nutrientes en cultivo discontinuo o en distintas fases de crecimiento en cultivos masivos.

Moreno-Garrido *et al.*, 1998, 1999; Schmitt *et al.*, 2001; Bhatnagar *et al.*, 2002 informan que las microalgas acumulan grandes cantidades de elementos como el cobre, silicio, calcio los cuales no segregan al medio de cultivo hasta después de algún tiempo. La incorporación de elementos en las microalgas se produce en dos fases, la primera que es muy rápida es la adsorción fisicoquímica en la superficie de las células, y la segunda fase que es muy lenta, es la acumulación intracelular (dependiente del metabolismo) y dadas las condiciones de cultivo.

La incorporación celular en cultivo semicontinuo de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} por *Isochrysis galbana* var. T-iso en base a los diferentes medios de cultivo probados, se muestra en las tablas 2-3 y figuras 6 a-b y 7a-b, resultados que nos indicaron la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones experimentadas ($p<0,05$). Demostrar que el caso del medio de cultivo **ADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8, 16mM) se obtuvieron coeficientes de correlación en la incorporación de S^{2-} , Mg^{2+} , Ca^{2+} y Zn^{2+} de $r^2=1$ en el caso de los 3 primeros elementos con

ajuste a una tendencia polinomial, en tanto que en el caso de Zn^{2+} un $r^2=0,98$ con ajuste a una tendencia lineal positiva (figura 8a). Por lo respecta al Fe^{3+} mostró una r^2 de 0,96 con ajuste a una tendencia exponencial positiva, elementos como el Si^{4+} , Se^{2-} y Cu^{2+} se ajustaron a una tendencia polinomial con una $r^2=1$, en los 3 casos (figura 8b).

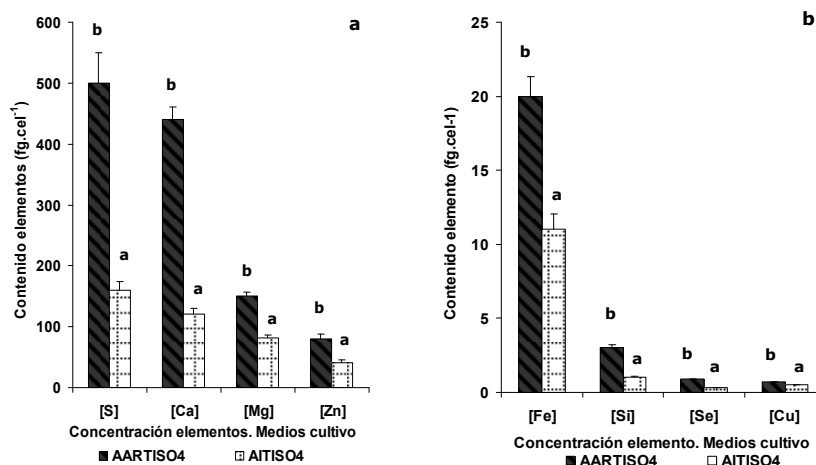


Figura 6.-Incorporación celular de elementos en *Isochrysis galbana* var. T-iso. en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con AARTISO4 y AITISO4: (a) S²⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, (b) Fe³⁺, Si⁴⁺, Se²⁻, Cu²⁺. Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

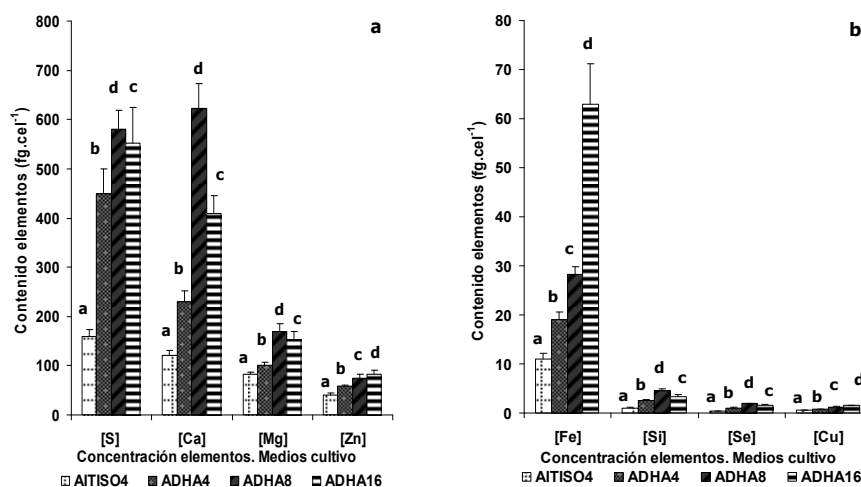


Figura 7.-Incorporación celular de elementos en *Isochrysis galbana* var. T-iso. en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con AITISO4, ADHA4, 8 y 16mM: (a) S²⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, (b) Fe³⁺, Si⁴⁺, Se²⁻, Cu²⁺. Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

Dicha incorporación de elementos en la célula respecto a los diferentes medios de cultivo, concuerda con la tendencia de el contenido celular de cenizas descrito en la *tabla 1* y *figura 6a*, al respecto Fábregas *et al.*,1996a; Fábregas *et al.*,1996b mencionan que *Phaeodactylum tricornutum* incrementa su volumen celular con la tasa de renovación lo que sugiere un mayor contenido de minerales por otra parte Reboloso Fuentes *et al.*,2000 mencionan que si los minerales son biodisponibles, no tóxicos o antinutricionales serán

empleados fisiológicamente y nutricionalmente por las células en adecuado balance de su concentración (Carvalho *et al.*, 2006).

Un incremento en la cantidad de los elementos-ingredientes de los medios de cultivo, provoca un descenso del peso orgánico acompañado de variaciones en el peso seco celular (*tabla 1*). En condición de abundancia de nutrientes, las microalgas captan mayores cantidades de elementos del medio, es así que la presión osmótica celular aumenta, dando lugar a una mayor absorción de aniones y cationes. Darley, 1987, menciona que es debido tal fenómeno a que en los diferentes medios de cultivo la presencia del ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) ayuda ya sea a incrementar la disponibilidad de los elementos presentes o disminuir los niveles tóxicos de los iones libres.

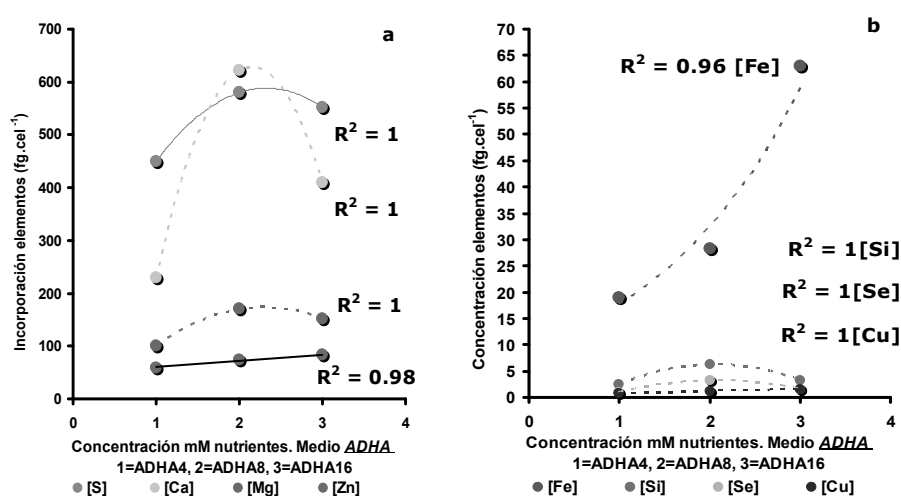


Figura 8.- Coeficientes de correlación en la incorporación celular de elementos en *Isochrysis galbana* var. T-iso. en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con el medio ADHA4, 8 y 16mM: **(a)** S²⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, **(b)** Fe³⁺, Si⁴⁺, Se²⁻, Cu²⁺. Media ± SD (n=5).

La disminución del contenido orgánico celular con respecto al peso seco, en *Isochrysis galbana* var. T-iso en base a los diferentes medios de cultivo empleados, fue compensado con un incremento del contenido de los elementos en las cenizas (*tablas 1*) y conforme se incremento la concentración de nutrientes. Son diversos los mecanismos activos y pasivos para la incorporación de metales por las microalgas (Otero, 1994). La pared celular de las microalgas tienen una gran capacidad para secuestrar o incorporar elementos (Wang *et al.*, 1998a). Este hecho es de una importancia especial, ya que las microalgas marinas constituyen el primer eslabón de la cadena trófica marina y por lo tanto, pueden transferir metales a niveles tróficos superiores (Folgar *et al.*, 2009); los cuales son de gran importancia ya que son responsables de una gran cantidad de procesos enzimáticos, antioxidantes y fisiológicos, que coadyuvan a mecanismos formadores de membrana, así como intervenir en procesos de metamorfosis en estadios larvales tempranos. Ferreira, 2006 en su estudio de incorporación de oligoelementos en cultivo semicontinuo en *Isochrysis galbana* var. T-iso menciona que a tasas de renovación entre el 30% y 50% inicia la saturación por nutrientes, con lo cual la tasa de incorporación celular de elementos se hace más eficiente, situación que

así sucedió con todos los elementos constituyentes en nuestros medios de cultivo a una tasa de renovación del 30%.

Los ácidos grasos (AG) más abundantes en *Isochrysis galbana* var. T-iso una vez cultivada con los medios de cultivo **AITISO4=ALGAL, AARTISO4, ADHA4, ADHA8 y ADHA16**, fueron el 14:0, 16:0, 18:1(n-9) y 18:4(n-3), resultados que concuerdan con los establecidos por Reitan *et al.*,1994 para la misma microalga. Los cuales se manifestaron en el rango del 6,84 al 26,76% (Lin *et al.*,2007); estimándose en conjunto entre el 61,03 y 69,40% del total de los AG (*tabla 4*), siendo los medios **AARTISO4, ADHA4, ADHA8 y ADHA16** en el rango de 61,80-69,40% diferentes del medio **AITISO4=ALGAL** con 61,03%; resultados cercanos a los reportados por Renaud *et al.*,1999 con 65 y 75%; y similares con los descritos por Ben-Amotz *et al.*,1985; Mourente *et al.*,1990. Nuestros resultados coinciden con diversos autores como Reitan *et al.*,1994; McCausland *et al.*,1999; Fernández-Reiriz *et al.*,1999; Nevejan *et al.*,2003; Devos *et al.*,2006; Lin *et al.*,2007; Delaporte *et al.*,2007 los cuales describen, que tal Haptofita posee al ácido mirístico (14:0) y palmítico (16:0) como los principales ácidos grasos saturados (entre el 17 y 19%), además de ácidos grasos monoinsaturados como el palmitoleico (16:1(n-7) que en este estudio fluctuó dependiendo del medio de cultivo (*tabla3*) entre el 5,34 y 7,56% y el elaídico (18:1(n-9) entre el 6,84 y 19,53%, siguiendo en importancia respecto a su concentración ácidos grasos poliinsaturados como el estearidónico 18:4n-3(11,82-26,76%), linoleico (18:2(n-6)(3,34-5,35%), alfa-linolénico (18:3(n-3)(3,64-6,68%), eicosapentaenoico (20:5(n-3)(0,22-0,77%), docosapentaenoico (22:5(n-6)(1,24-1,97) y docosahexaenoico (22:6(n-3)(6,68-9,68), ácidos grasos que fluctuaron (*tabla3*) dependiendo del medio de cultivo empleado. La complejidad elemental así como su adecuada concentración en los nuevos medios de cultivo, nos demuestra cuan versátil suele resultar *Isochrysis galbana* var. T-iso en el metabolismo de los lípidos y con ello inducir la cantidad de sus ácidos grasos principales (Harwood and Guschina, 2009; Mata *et al.*,2010).

Cada medio de cultivo en base a su constitución elemental y concentración de ellos, es que mostraron diversos grados de comportamiento respecto a incrementar o decrecer porcentualmente tales AG. Siendo un hecho, que en base a la concentración del ácido palmítico (16:0) y palmitoleico (16:1(n-7) fue posible la elongación y desaturación vía enzimática (Huang *et al.*,2010) a otros ácidos grasos de cadena más larga, importantes y de concentración apreciable en esta haptofita, como lo fueron el 18:0, 18:1(n-9), 18:1(n-7), 18:2(n-6), 18:3(n-3), 18:4(n-3) que originaron series de otros AG insaturados de cadena aun más larga como son el ácido araquidónico (20:4(n-6), eicosapentaenoico (20:5(n-3), erúcico 22:1(n-9), docosapentaenoico 22:5(n-6) y docosahexaenoico (22:6(n-3) (*tabla 3*); de modo que se demostró la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$) con respecto a los ácidos grasos totales (*tabla 3* y *figura 9a*). Destacar a el ácido graso docosahexaenoico (DHA) el cual con los medios **AITISO4=ALGAL, AARTISO4**, así como diferentes concentraciones de la formulación **ADHA** (4, 8, y 16 mM), observó una oscilación entre el 6,68 y 9,68% de DHA, existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de

experimentación ($p < 0,05$), al respecto Lin *et al.*, 2007 menciona que el incremento del ácido docosahexaenoico (22:6(n-3)) es debido al aumento del ácido palmítico (16:0), esteárico (18:4n-3) y docosapentaenoico (22:5(n-3)); tal y como sucedió en el presente estudio (tabla 3). El rango de variación de nuestros resultados con los nuevos medios de cultivo son muy similares a los reportados por Ferreira, 2006 con la misma tasa de renovación, medio de cultivo "ALGAL" con una concentración de nutrientes 4mM, en estudios sobre la presencia ausencia de CO₂ y diferentes intensidades lumínicas con valores de 6,4 y 9,66%. Indicar que el incremento en la concentración de nutrientes en el medio **ADHA** (4, 8, 16mM) mostró un coeficiente de correlación $r^2=1$, con un ajuste a una tendencia lineal positiva (figura 9b) en el aumento del ácido graso 22:6(n-3) en la célula, y que es reflejo de la evolución de sus lípidos celulares. Así mismo el ácido graso 20:5(n-3) reveló con la diferente concentración de dicho medio de cultivo, un ajuste a una tendencia polinomial con un valor de $r^2=1$ (figura 9b).

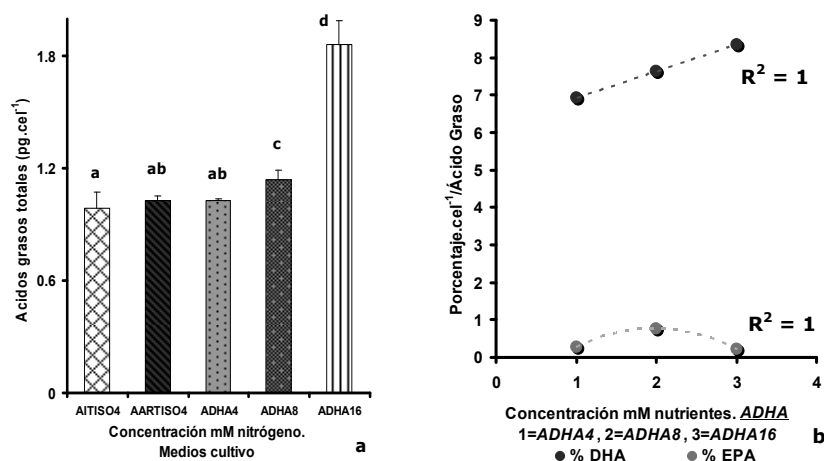


Figura 9.- (a) Contenido de Ácidos grasos totales por célula de *Isochrysis galbana* var. T-iso. en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficientes de correlación **EPA** y **DHA** medio de cultivo ADHA4, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p < 0,05$).

El máximo contenido de AGT pg.cel⁻¹ que correspondió, del contenido lipídico celular en *Isochrysis galbana* var. T-iso con los diferentes medios de cultivo fue el siguiente: **AITISO4=ALGAL**(24,67%), **AARTISO4**(22,42%), **ADHA4**(21,55%), **ADHA8**(17,64%), **ADHA16**(21,60%). Valores que se encuentran dentro del rango descrito por Ferreira, 2006 en sus estudios sobre cultivos con diferentes intensidades lumínicas, tasa de renovación del 30%, con el medio de cultivo "ALGAL" con una concentración de nutrientes 4mM describiendo valores entre un 23 y 36%. Volkman *et al.*, 1989 y Devos *et al.*, 2006 mencionan que tales porcentajes de AGT de los lípidos totales, son debidos a que *Isochrysis galbana* var. T-iso presenta una gran variedad de clases de lípidos (lípidos neutros, glucolípidos y fosfolípidos) por lo que una gran parte de estos son lípidos no formados por ácidos grasos (no acílicos), tales como esteroides, hidrocarburos, alquenonas o pigmentos.

Lípidos no formados por ácidos grasos que más contribuyen al contenido lipídico en esta haptofita son las alquenonas, metil y etilalquenonas, alquenoatos, y alquenos de cadena larga entre 36 y 39 carbonos, frecuentemente con dobles enlaces (Volkman *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1993; Versteegh *et al.*, 2001; Eltgoth *et al.*, 2005). Los perfiles de ácidos grasos de los lípidos tanto neutros y fracciones glucolípidicas no son muy diferentes de la fracción lipídica total. Sin embargo, la fracción de fosfolípidos la mas importante, muestra una muy diferente composición de ácidos grasos (Tocher *et al.*, 2008). Devos *et al.*, 2006 indican que una vez cuantificado la concentración de DHA en las diferentes clases de lípidos se pudo observar que los fosfolípidos representan el 75% del DHA total por célula. En microalgas, los lípidos polares (fosfolípidos y glicolípidos) generalmente contienen grandes cantidades de PUFA n-3 de lípidos neutros. Por otra parte Reitan *et al.*, 1994 mencionan con limitación de fósforo un rango de variación entre 32 y 53% valores por encima de los obtenidos en el presente estudio. La fracción relativamente baja de ácidos grasos, probablemente puede explicarse por altas fracciones de ácidos grasos inusuales, junto con un alto contenido de lípidos no formadores de ácidos grasos (Kayama *et al.*, 1989) y que se demuestra con nuestros resultados, ya que tales ácidos grasos se encuentran en el rango del 24 al 17%. La diversidad e incremento de nutrientes experimentada con el medio de cultivo **ADHA** y **AARTISO4** parece no ser un factor determinante para que exista una gran variación de la cantidad de glucolípidos y fosfolípidos, pero si fue evidente observar un incremento en concentración de ácidos grasos de cadena larga como el EPA y DHA con respecto a los descritos con el medio de cultivo control (**AITISO4=ALGAL**) ver *tabla 3*.

Se hallaron importantes diferencias en el contenido porcentual y $\mu\text{g} \cdot \text{cel}^{-1}$ de los ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGM) y poliinsaturados (AGP), existiendo en todos los casos diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo experimentadas ($p<0,05$) ver *tabla 4* y *figura 10a*. Demostrar que en el caso del medio de cultivo **ADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) la evolución de dichos ácidos grasos expresó coeficientes de correlación $r^2=0,94$ (AGP), 0,90(AGS), 0,98(AGM), con ajuste a una tendencia lineal positiva en el 1er caso y negativa en el 2do y 3er caso (*figura 10b*). El decremento por tanto de los AGS más AGM correspondió con el incremento de los AGP ver *figuras 10a* y *tabla 4*. Destacar que el contenido de AGP de los medios de cultivo **AARTISO4**, **ADHA8** y **ADHA16** mostraron valores superiores en rendimiento con respecto a la condición control **AITISO4=ALGAL** (*figura 10a*). Lin *et al.*, 2007 mencionan que los AGS y los AGM así como los AGP subtotales aumentan de manera exponencial a principios de la fase estacionaria para posteriormente disminuir en la fase estacionaria tardía. *Isochrysis galbana* var. T-iso posee entre un 66,9% y 80% de AGS+AGM; tal rango de variación concuerda con los resultados aquí descritos (*tabla 4*).

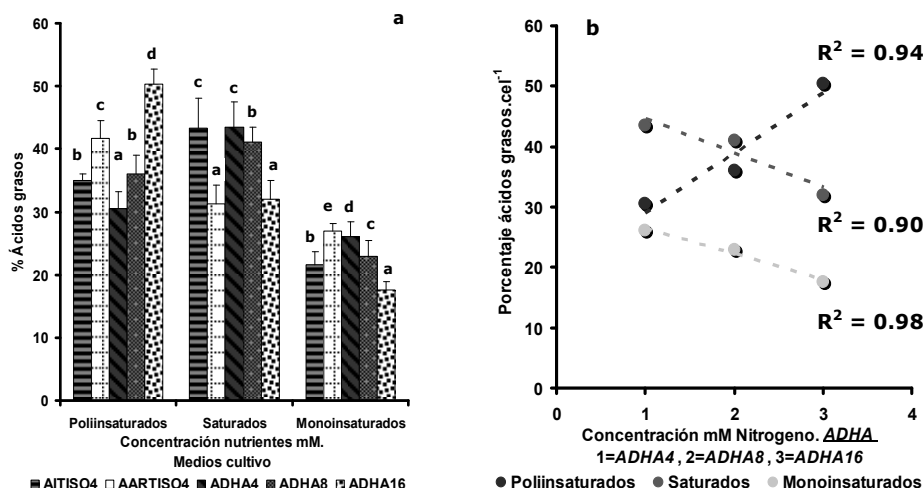


Figura 10.- (a) Contenido porcentual de Ácidos grasos por célula de *Isochrysis galbana* var. T-iso. en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficientes de correlación ácidos grasos, medio de cultivo **ADHA4**, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

Los ácidos grasos poliinsaturados se subdividen en tres familias, mediante las cuales se derivan los procesos de elongación a ácidos grasos de cadena larga como son la **serie ω -9, ω -6 y ω -3**; de las cuales, las series importantes son la ω -3 y ω -6, así mismo la proporción entre estas dos series es de relevante importancia en el valor energético celular en los siguientes niveles tróficos, por lo que una mayor proporción de los ω -3 es imprescindible en mecanismos formadores de membrana en etapas tempranas de desarrollo larval de organismos marinos. Es así que las proporciones de ácidos grasos **ω -3: ω -6** por célula de *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con los medios **AITISO4=ALGAL, AARTISO4 ADHA4, ADHA8 y ADHA16** mostraron los siguientes resultados 0,90, 1,33, 1,30, 1,78 y 2,61% comparativamente (tabla 3) por lo tanto se hallaron diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$) (ver figura 11a) y como se puede observar los medios **AARTISO4 ADHA4, ADHA8 y ADHA16** mostraron un mejor rendimiento con respecto al medio **AITISO4=ALGAL**. Se obtuvo un índice de correlación $r^2=0,94$ (figura 11b) con ajuste a una tendencia lineal positiva en el medio **ADHA** respecto a dicha proporción, cuando se incremento la concentración de nutrientes (4, 8, y 16 mM). Valores que estuvieron por debajo de los reportados por Ferreira, 2006 (5,72-5,87%) empleando diferentes intensidades de luz, tasa de renovación del 30% y el medio de cultivo "ALGAL" con una concentración de nutrientes 4mM. Por otra parte el medio de cultivo **ADHA16** indico estar dentro de los valores reportados por Lin *et al.*, 2007 con la misma especie de haptofita que el presente estudio con valores entre 2,3 y 4,9% entre fase exponencial y fase estacionaria tardía en fotobioreactores batch con medio de cultivo Walne rico en complejos de hierro.

La proporción **ω -3: ω -6** representa el cociente entre los ácidos grasos correspondientes a los grupos omega 3 y omega 6, siendo un parámetro para estimar el valor nutritivo celular de las microalgas. Una alta proporción de ácidos grasos altamente poliinsaturados **ω -3** a **ω -6** se ha utilizado como un índice de alto valor nutritivo para los organismos en acuicultura (Fidalgo *et al.*,1998).

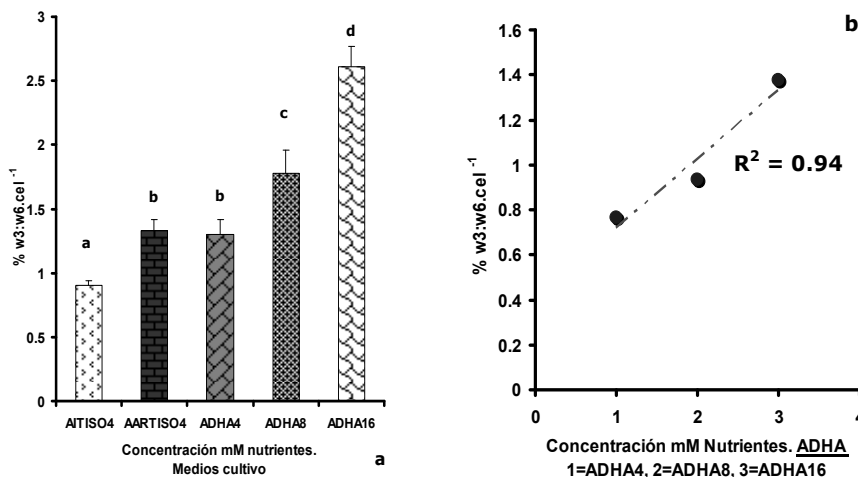


Figura 11. (a) Contenido porcentual de Ácidos grasos **w3:w6** por célula de *Isochrysis galbana* var. T-iso. en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficiente de correlación ácidos grasos **w3:w6**, medio de cultivo **ADHA4**, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existen diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

Desde el punto de vista nutricional un aspecto importante, el cual se debe tener en cuenta en niveles superiores de la trama trófica alimenticia; es la proporción que existe entre el ácido docosahexaenoico (22:6n-3 DHA), eicosapentaenoico (20:5n-3 EPA) y el ácido araquidónico (20:4n-6 ARA), tal proporción es muy importante en la alimentación de las primeras etapas de desarrollo larval.

En la mayoría de los peces planos, la metamorfosis y desarrollo de una adecuada pigmentación son controlados a nivel nervioso y neuroendocrinológico. En consecuencia, la producción anormal de eicosanoides en el cerebro como resultado de la alteración de los niveles de ARA y EPA trae consigo graves consecuencias para el desarrollo y la metamorfosis de las larvas de peces planos, incluyendo su anormal pigmentación; por lo que la proporción de EPA que promueve la formación de membranas a nivel celular sobre la proporción de ARA deberá ser siempre superior (Estévez *et al.*,1999).

En el presente ensayo, motivo de la modificación del medio de cultivo **ALGAL=AITISO4** por la inclusión de Mg²⁺, Ca²⁺, Si⁴⁺, Se²⁻, Fe³⁺, S²⁻, Zn²⁺ y Cu²⁺ en concentraciones óptimas, es que produjeron las formulaciones **AARTISO4 ADHA4, ADHA8 y ADHA16**; las cuales se probaron en el cultivo de *Isochrysis galbana* var. T-iso con la finalidad de probar si era posible modificar la proporción EPA:ARA con respecto al medio **ALGAL=AITISO4**, indicar que fue posible en el rango de 0,55:1% al 1,54:1% por célula como se puede observar en la *tablas 4* con respecto a la proporción 0,31:1% del **ALGAL=AITISO4**; por lo tanto existieron diferencias altamente significativas ($p=0,001$)

entre las condiciones de experimentación ($p < 0,05$). Valores importantes en proporción ya que Estévez *et al.*, 2001; Bell *et al.*, 2003 concluyen que una alta incidencia en la malpigmentación de larvas de peces planos es debida a un pobre enriquecimiento de las presas vivas vía las microalgas con una proporción 0,3:1% de EPA/ARA en contraste con una proporción 4,1:1% de EPA/ARA donde problemas de malpigmentación en estadios larvales tempranos de peces planos no fueron evidentes, Sargent *et al.*, 1999 mencionan que una proporción 4,2:1 EPA/ARA es esencial para una normal supervivencia, crecimiento, pigmentación y metamorfosis en larvas de rodaballo. Un exceso en la producción de eicosanoides derivados del ácido araquidónico en el cerebro o en la pituitaria de larvas, vía estrés, altera el control neuroendocrino de los procesos implicados en el desarrollo de la pigmentación durante la metamorfosis de peces planos (Estévez *et al.*, 1999).

Los peces marinos contienen grandes cantidades de ácido docosahexaenoico (22:6 n-3 DHA) eicosapentaenoico (20:5 n-3 EPA) en los fosfolípidos de las membranas celulares. Los peces marinos no pueden biosintetizar DHA *de novo*, ni de los precursores de cadena más corta, como es el ácido alfa-linolénico (18:3 n-3). Por lo tanto, DHA y EPA serán componentes esenciales de la dieta en los peces marinos especialmente en etapas tempranas de desarrollo larval específicamente la metamorfosis. El DHA está presente en concentraciones muy elevadas en las membranas de células neuronales y visuales, particularmente en las membranas celulares externas así como membranas sinaptosomales, en peces como en mamíferos (Sargent *et al.*, 1997, 1999).

Por lo tanto, una insuficiencia de DHA en la dieta de larvas tempranas de peces marinos es que puede perjudicar el desarrollo neurológico y visual con graves consecuencias para una serie de procesos fisiológicos y de comportamiento incluyendo los que dependen neuroendocrinológicamente.

Pigmentación anormal es común en los cultivos de larvas de peces planos marinos, y se puede mejorar sustancialmente rectificando el nivel de DHA en las larvas mediante el alimento vivo (Kanazawa *et al.*, 1981; Kanazawa, 1993; Reitan *et al.*, 1994b; McEvoy *et al.*, 1998b). Se ha considerado que la mal pigmentación puede ser consecuencia de un mal funcionamiento neuronal o visual, por ejemplo, de procesamiento anormal de las señales visuales, ya sea en el propio ojo, o posteriormente en el cerebro, desde la producción anormal de la hormona estimulante de melanocitos en el cerebro, de frente a perturbaciones en las conexiones sinápticas entre los nervios y el melanóforos en la piel. El síndrome de mal pigmentación es causado por una deficiencia de DHA o un exceso de EPA, por lo que diversos autores han documentado la importancia de una alta razón DHA:EPA (Kraul, 1993; Mourente *et al.*, 1993; Reitan *et al.*, 1994b; Lavens *et al.*, 1995).

Es así que la proporción de ácidos grasos (AG) **DHA:EPA** por célula con respecto a su cultivo con las diferentes formulaciones, mostró diferencias altamente significativas ($p = 0,001$) entre las condiciones de experimentación ($p < 0,05$) (figura 12a y tabla 3), con un índice de correlación de 0,90 (figura 12b) con tendencia lineal positiva, cuando es empleado el medio de cultivo **ADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8, 16mM). La proporción porcentual de los AG **DHA:EPA** con los medios **AARTISO4 ADHA4, ADHA8 y ADHA16** se encontró entre 18,61:1% y 37,95:1% con respecto al medio **AITISO4=ALGAL**

Capítulo 6: Evaluación del efecto de los medios de cultivo **Algal Alto Rendimiento (AAR)** y **Algal Incremento Concentración DHA (ADHA)** en diferentes concentraciones de nitrógeno, sobre la generación de biomasa, composición bioquímica, e incorporación elemental de ***I. galbana* var. T-iso**.

con un valor de 13,36:1% (tabla 3). Destacar que la proporción **DHA:EPA** encontrada con la mayoría de los medios de cultivo aquí estudiados superó lo reportado por Reitan *et al.*, 1994b en Sargent *et al.*, 1999 donde logra eliminar la mal pigmentación de larvas de rodaballo incluyendo aceite refinado de atún rico en DHA en proporción **DHA:EPA** 2:1%. Es de destacar que esta es esencialmente la misma proporción de DHA:EPA que existe en la yema de los muchos huevos y larvas de peces marinos (Tocher and Sargent, 1984).

Sui *et al.*, 2007 observó que en larvas de cangrejo chino *Eriocheir sinensis* proporciones dietarias DHA:EPA de 0,68:0,28 mostraban un inferior desarrollo larval y supervivencia con respecto a tratamientos con altas proporciones dietarias DHA:EPA de 2,85:1,17; lo que indica que altos niveles de ácidos grasos altamente poliinsaturados y en correcto balance DHA y EPA mejoran la respuesta larval al estrés. Por otra parte George *et al.*, 2008 empleando a la microalga *Isochrysis galbana* var. T-iso como dieta en el cultivo de larvas del equinodermo *Dendraster excentricus* obtuvieron buen crecimiento, metamorfosis y desarrollo con proporciones DHA:EPA 7,43:1%.

En lo que concierne a las proporciones de ácidos grasos **DHA:ARA** por célula en base a los diferentes medios estudiados en el cultivo de *Isochrysis galbana* var. T-iso se hallaron diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$) (tabla 3), con un índice de correlación de 0,96 (figura 12b) con tendencia lineal negativa cuando es empleado el medio de cultivo **ADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8, 16mM). La proporción porcentual celular de los AG **DHA:ARA** con los diferentes medios de cultivo se encontró entre 10,19:1% y 23,90:1% (tabla 3) con las recetas **AARTISO4 ADHA4, ADHA8 y ADHA16** resultados por encima de los encontrados en **AITISO4=ALGAL** con 4,12:1%. Los requerimientos para estos ácidos grasos esenciales no pueden ser considerados separadamente. Alterándose la dosis dietaria de uno de ellos tendrá influencia en el balance de **ARA:EPA:DHA** debido a interacciones competitivas y conversiones metabólicas (Sargent *et al.*, 1999)

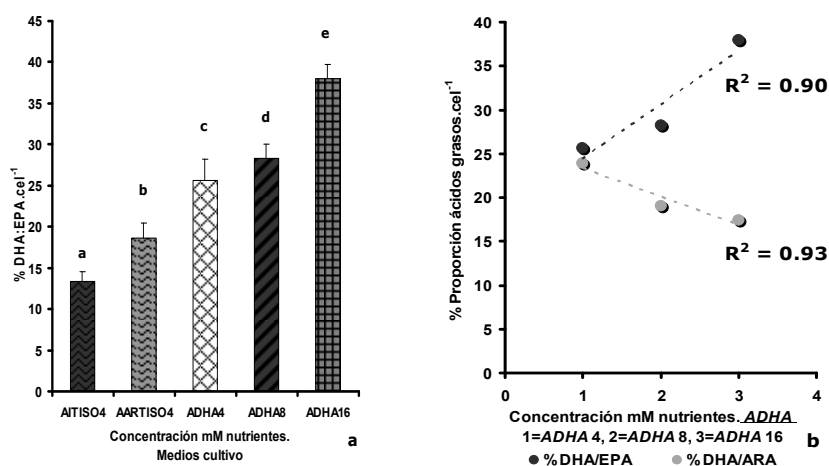


Figura 12. (a) Contenido porcentual de Ácidos grasos **DHA:EPA** por célula de *Isochrysis galbana* var. T-iso. en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficientes de correlación ácidos grasos **DHA:EPA, DHA:ARA** con el medio de cultivo **ADHA4, 8 y 16mM**. Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existen diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

La nutrición mineral y los efectos de la variación en la composición del medio de cultivo en la producción de ácidos grasos es posible mediante la inclusión en el medio de cultivo de ciertos elementos que además de cumplir con funciones fisiológicas celulares, coadyuvan en la calidad bioquímica de la misma. Comportamientos similares en la cantidad de los ácidos grasos han sido manifestados por Feng *et al.*, 2005; los cuales concluyen que la adición en el medio de cultivo de moléculas orgánicas e inorgánicas mejora la producción de lípidos y ácidos grasos poliinsaturados en microalgas.

Reboloso Fuentes *et al.*, 2000 mencionan que los minerales si son biodisponibles y no tóxicos en la microalgas estas podrían ser utilizadas con fines alimenticios, debido a la cantidad y la diversidad de nutrientes que contienen. Además, de que la composición de la biomasa puede ser modificada por medio de variables operacionales, principalmente mediante el uso de los tiempos de residencia corta para obtener mayores concentraciones de AG poliinsaturados como el ARA, EPA, y DHA además de un mayor enriquecimiento por proteína.

Tabla 1
Cultivo en semicontinuo de *Isochrysis galbana* var. T-iso con Algal Alto Rendimiento (AAR) y Algal Incremento Concentración DHA (ADHA) (modificado de Fábregas *et al.*, 1984). Concentración de nutrientes 4, 8, 16 mg át. N/L
Tasa de renovación 30%.día⁻¹

	AITiso 4mM	AARTiso 4mM	ADHA 4mM	ADHA 8mM	ADHA 16mM
Densidad celular (10⁶ cél.mL⁻¹ std)	51,85a ±5,59	94,72b ±4,31	91,85b ±8,30	107,55c ±10,10	57,08a ±4,74
Productividad (10⁹ céls.L⁻¹.día⁻¹)	15,55	28,42	27,55	32,26	17,12
% proteína en F.O.	35,68	34,02	23,96	39,13	48,07
% carboh. en F.O.	27,44	37,57	46,76	23,75	15,15
% lípidos en F.O.	36,88	28,41	29,28	37,11	36,76
Proteína (pg.célula⁻¹ ± std)	3,87a ±0,40	5,50b ±0,14	3,90a ±0,20	5,75b ±0,23	11,28c ±1,02
Carbohidratos (pg.célula⁻¹ ± std)	2,98a ±0,26	6,07d ±0,51	7,62e ±0,71	5,49c ±0,23	3,55b ±0,34
Lípidos (pg.célula⁻¹ ± std)	4,00a ±0,24	4,59ab ±0,57	4,77ab ±0,44	6,45b ±0,22	8,62c ±0,79
Peso orgánico pg.cel⁻¹	10,85	16,16	16,29	17,69	23,45
Valor calórico (10⁻⁷ J.célula⁻¹)	3,02a	4,17ab	4,11ab	4,87b	6,73c
Peso seco µg.mL⁻¹ ±std	1275,53 ±126,44	2499,47 ±242,72	2642,47 ±215,87	3478,00 ±263,56	2498,67 ±31,86
Peso seco (pg.cel⁻¹ ±std)	12,82a ±1,53	20,02b ±2,34	20,33b ±2,42	22,36c ±2,06	30,06d ±3,28
Cenizas (pg.cel⁻¹ ±std)	1,97a ±0,15	3,86b ±0,46	4,04c ±0,39	4,67d ±0,68	6,61e ±0,32
Materia Orgánica (pg.cel⁻¹ ±std)	10,85a ±1,16	16,14b ±1,13	16,29b ±1,47	17,69c ±1,92	23,45d ±1,38
Nitrógeno Residual mM ± std	0,83 ±0,025	0,23 ±0,027	0,25 ±0,014	0,31 ±0,03	0,50 ±0,03
Tasa Máxima de Crecimiento (div.día⁻¹)	1,63	2,10	2,54	2,37	2,31
Q_N celular (pg)	0,49a ±0,18	1,08d ±0,14	0,63b ±0,04	0,93c ±0,49	1,68e ±0,13
Q_C celular (pg)	3,32a ±1,03	12,99e ±1,71	8,16c ±0,88	7,18b ±3,66	9,77d ±0,90
RelaciónC:N(átomos)	5,78b	10,28d	11,05e	6,64c	4,98a

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=5). AITiso = Algal Industrial *Isochrysis galbana* var. T-iso, AARTiso = Algal Alto Rendimiento *Isochrysis galbana* var. T-iso, ADHA4, 8, 16= Algal Docosahexaenóico 4, 8, 16 mM.

Tabla 2

Absorción atómica de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en concentraciones óptimas en células de *Isochrysis galbana* var. T-iso (cultivo semicontinuo) cultivadas con Algal Alto Rendimiento (AARTISO**) (modificado de Fábregas et al., 1984) y Algal Industrial® (**AITISO**) (Fábregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹**

Constituyentes <i>AITISO4</i>	Absorción Atómica (fg.célula ⁻¹)	Constituyentes <i>AARTISO4</i>	Absorción Atómica (fg.célula ⁻¹)
S(0)mM	160,0a ±14,0	S(0,1)mM	500,0b ±49,15
Ca(0)mM	120,0a ±10,0	Ca(10,0)mM	440,0b ±20,02
Mg(0)mM	82,0a ±4,4	Mg(10,0)mM	150,0b ±70,0
Zn(1,0)mM	41,0a ±3,8	Zn(1,0)mM	80,0b ±7,10
Fe(20,0)mM	11,0a ±1,06	Fe(20,0)mM	20,0b ±1,3
Si(0)mM	1,0a ±0,1	Si(1,0)mM	3,0b ±0,02
Se(0)mM	0,3a ±0,02	Se(1,0)mM	0,9b ±0,02
Cu (0,1)mM	0,5a ±0,02	Cu (1,0)mM	0,7b ±0,04

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=5). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

Tabla 3

Absorción atómica de elementos en concentraciones optimas en células de *Isochrysis galbana* var. T-iso (cultivo semicontinuo) cultivadas con Algal Incremento Cantidad DHA (ADHA) (modificado de Fábregas et al.,1984) y Algal Industrial® (AITISO4) (Fábregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4, 8, 16 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹

Constituyentes <i>AITISO4</i>	Absorción Atómica (fg.célula ⁻¹)	Constituyentes <i>ADHA4</i>	Absorción Atómica (fg.célula ⁻¹)	Constituyentes <i>ADHA8</i>	Absorción Atómica (fg.célula ⁻¹)	Constituyentes <i>ADHA16</i>	Absorción Atómica (fg.célula ⁻¹)
S(0)mM	160,0a ±14,0	S(1,0)mM	450,0b ±49,10	S(1,0)mM	580,12d ±39,10	S(1,0)mM	552,25c ±72,31
Ca(0)mM	120,0a ±10,0	Ca(1,0)mM	230,0b ±21,0	Ca(1,0)mM	622,14d ±50,0	Ca(1,0)mM	409,05c ±37,15
Mg(0)mM	82,0a ±4,4	Mg(1,0)mM	100,0b ±7,25	Mg(1,0)mM	170,0d ±16,0	Mg(1,0)mM	152,43c ±16,04
Zn(1,0)mM	41,0a ±3,8	Zn(1,0)mM	59,0b ±1,95	Zn(1,0)mM	74,15c ±8,05	Zn(1,0)mM	83,28d ±7,76
Fe(20,0)mM	11,0a ±1,06	Fe(20,0)mM	19,0b ±1,65	Fe(20,0)mM	28,25c ±1,6	Fe(20,0)mM	63,03d ±8,1
Si(0)mM	1,0a ±0,1	Si(1,0)mM	2,5b ±0,3	Si(1,0)mM	4,5d ±0,38	Si(1,0)mM	3,3c ±0,38
Se(0)mM	0,3a ±0,02	Se(0,1)mM	1,0b ±0,12	Se(0,1)mM	1,9d ±0,14	Se(0,1)mM	1,2c ±0,1
Cu (0,1)mM	0,5a ±0,02	Cu (1,0)mM	0,7b ±0,04	Cu (1,0)mM	1,6c ±0,08	Cu (1,0)mM	1,5c ±0,14

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=5). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

Tabla 3. Composición de Ácidos Grasos (% del total A.G.), ácidos grasos x célula (A.G. pg.cél⁻¹) y lípidos totales x célula (pg.cél⁻¹) en *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con *Algal Industria*[®] (AITISO4mM), *Algal Alta Rendimiento* (AARTISO4mM), *Algal Incremento DHA* (ADHA4.8, 16mM)...

Ácido Graso	(AITISO4)			(AARTISO4)			(ADHA4)			(ADHA8)			(ADHA16)		
	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	pg.cél ⁻¹
12:0	0.08±0.00	0.0008±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	0.0003±0.00	0.03±0.00	0.08±0.00	0.0003±0.00	0.08±0.00	0.0009±0.00	0.009±0.00	0.06±0.00	0.0012±0.00	0.0012±0.00	0.0012±0.00
14:0	17.05±0.94	0.169±0.025	12.08±1.24	12.08±1.24	0.124±0.015	18.28±0.19	18.28±0.19	0.188±0.000	21.05±0.64	0.240±0.018	0.240±0.018	17.70±0.65	0.329±0.019	0.329±0.019	0.329±0.019
15:0	4.20±0.54	0.045±0.003	0.68±0.02	0.68±0.02	0.007±0.000	0.57±0.03	0.57±0.03	0.006±0.000	0.82±0.02	0.009±0.000	0.009±0.000	0.60±0.03	0.011±0.001	0.011±0.001	0.011±0.001
16:0	18.39±1.12	0.181±0.005	15.02±1.02	15.02±1.02	0.155±0.014	20.42±0.28	20.42±0.28	0.210±0.001	16.53±0.83	0.188±0.018	0.188±0.018	11.10±0.16	0.207±0.014	0.207±0.014	0.207±0.014
16:1(n-7)	6.64±0.20	0.065±0.005	5.34±0.19	5.34±0.19	0.055±0.003	5.67±0.07	5.67±0.07	0.058±0.001	5.75±0.35	0.066±0.007	0.066±0.007	7.56±0.07	0.141±0.011	0.141±0.011	0.141±0.011
16:2(n-6)	0.37±0.03	0.004±0.000	0.26±0.01	0.26±0.01	0.003±0.000	0.27±0.00	0.27±0.00	0.003±0.000	0.41±0.01	0.005±0.000	0.005±0.000	0.74±0.01	0.014±0.001	0.014±0.001	0.014±0.001
16:2(n-4)	1.05±0.08	0.010±0.001	0.91±0.04	0.91±0.04	0.009±0.000	1.03±0.03	1.03±0.03	0.011±0.000	0.68±0.08	0.008±0.000	0.008±0.000	1.36±0.02	0.025±0.002	0.025±0.002	0.025±0.002
18:0	2.20±0.25	0.021±0.002	2.29±0.16	2.29±0.16	0.024±0.001	3.24±0.08	3.24±0.08	0.033±0.000	1.51±0.18	0.017±0.001	0.017±0.001	0.68±0.02	0.013±0.001	0.013±0.001	0.013±0.001
18:1(n-9)	11.61±1.50	0.114±0.006	19.53±1.23	19.53±1.23	0.201±0.009	18.88±0.30	18.88±0.30	0.194±0.001	15.13±0.30	0.172±0.005	0.172±0.005	6.84±0.24	0.127±0.011	0.127±0.011	0.127±0.011
18:1(n-7)	1.59±0.18	0.016±0.001	1.28±0.07	1.28±0.07	0.013±0.001	0.98±0.03	0.98±0.03	0.010±0.000	1.10±0.01	0.012±0.000	0.012±0.000	2.39±0.33	0.044±0.002	0.044±0.002	0.044±0.002
18:2(n-6)	3.34±0.34	0.033±0.001	5.35±0.12	5.35±0.12	0.055±0.001	4.68±0.17	4.68±0.17	0.048±0.002	4.16±0.08	0.047±0.003	0.047±0.003	3.36±0.16	0.063±0.006	0.063±0.006	0.063±0.006
18:3(n-6)	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
18:3(n-3)	4.23±0.48	0.042±0.002	5.97±0.27	5.97±0.27	0.061±0.001	3.67±0.42	3.67±0.42	0.038±0.005	5.20±0.00	0.059±0.003	0.059±0.003	6.68±0.32	0.124±0.006	0.124±0.006	0.124±0.006
18:4(n-3)	13.98±0.49	0.138±0.008	15.17±0.30	15.17±0.30	0.156±0.004	11.82±0.90	11.82±0.90	0.122±0.011	15.33±0.83	0.174±0.001	0.174±0.001	26.76±1.28	0.499±0.045	0.499±0.045	0.499±0.045
20:0	1.11±0.11	0.011±0.001	1.00±0.12	1.00±0.12	0.010±0.002	0.82±0.07	0.82±0.07	0.008±0.000	1.04±0.03	0.012±0.001	0.012±0.001	1.94±0.07	0.036±0.004	0.036±0.004	0.036±0.004
20:1(n-9)	0.12±0.01	0.001±0.000	0.08±0.00	0.08±0.00	0.008±0.000	0.15±0.02	0.15±0.02	0.002±0.000	0.20±0.01	0.002±0.000	0.002±0.000	0.08±0.00	0.0014±0.00	0.0014±0.00	0.0014±0.00
20:2(n-9)	0.22±0.01	0.002±0.000	0.24±0.02	0.24±0.02	0.0024±0.000	0.21±0.00	0.21±0.00	0.002±0.000	0.41±0.01	0.005±0.000	0.005±0.000	0.39±0.03	0.007±0.000	0.007±0.000	0.007±0.000
20:3(n-5)	1.40±0.12	0.014±0.002	0.81±0.02	0.81±0.02	0.008±0.000	0.06±0.00	0.06±0.00	0.006±0.000	0.10±0.01	0.001±0.000	0.001±0.000	0.48±0.04	0.0007±0.00	0.0007±0.00	0.0007±0.00
20:4(n-6)	1.62±0.15	0.016±0.001	0.95±0.01	0.95±0.01	0.010±0.001	0.29±0.04	0.29±0.04	0.003±0.000	0.40±0.05	0.006±0.000	0.006±0.000	0.04±0.00	0.009±0.000	0.009±0.000	0.009±0.000
20:4(n-3)	0.03±0.00	0.0003±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.0001±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.0002±0.00	0.03±0.00	0.0004±0.00	0.0004±0.00	0.01±0.00	0.0002±0.00	0.0002±0.00	0.0002±0.00
20:5(n-3)	0.50±0.01	0.005±0.000	0.52±0.02	0.52±0.02	0.005±0.000	0.27±0.03	0.27±0.03	0.003±0.000	0.27±0.08	0.009±0.000	0.009±0.000	0.22±0.03	0.004±0.000	0.004±0.000	0.004±0.000
22:0	0.43±0.03	0.004±0.000	0.19±0.03	0.19±0.03	0.002±0.000	0.12±0.01	0.12±0.01	0.0012±0.00	0.07±0.00	0.0008±0.00	0.0008±0.00	0.03±0.00	0.0005±0.00	0.0005±0.00	0.0005±0.00
22:1	1.64±0.15	0.016±0.002	0.72±0.02	0.72±0.02	0.007±0.000	0.35±0.01	0.35±0.01	0.004±0.000	0.76±0.03	0.009±0.000	0.009±0.000	1.22±0.12	0.022±0.002	0.022±0.002	0.022±0.002
22:5(n-6)	1.53±0.14	0.015±0.001	1.97±0.19	1.97±0.19	0.020±0.003	1.24±0.14	1.24±0.14	0.013±0.001	1.32±0.14	0.015±0.001	0.015±0.001	1.42±0.13	0.027±0.004	0.027±0.004	0.027±0.004
22:6(n-3)	6.68±0.30	0.065±0.008	9.68±0.58	9.68±0.58	0.099±0.001	6.93±0.37	6.93±0.37	0.071±0.003	7.63±0.44	0.085±0.002	0.085±0.002	8.35±0.47	0.156±0.019	0.156±0.019	0.156±0.019
Saturados	43.38±4.67	0.431±0.045	31.27±2.93	31.27±2.93	0.322±0.038	43.45±0.64	43.45±0.64	0.447±0.001	41.02±2.51	0.467±0.050	0.467±0.050	32.04±0.94	0.596±0.039	0.596±0.039	0.596±0.039
Monounsaturados	21.54±2.2c	0.211±0.006	26.95±1.1b	26.95±1.1b	0.277±0.008	26.03±0.4d	26.03±0.4d	0.268±0.001	22.94±0.5c	0.261±0.018	0.261±0.018	17.56±1.4a	0.327±0.038	0.327±0.038	0.327±0.038
Poliinsaturados	34.95±2.7b	0.344±0.007	41.75±2.7c	41.75±2.7c	0.429±0.022	30.49±1.0a	30.49±1.0a	0.314±0.014	35.96±2.9b	0.408±0.014	0.408±0.014	50.33±2.3d	0.937±0.073	0.937±0.073	0.937±0.073
ω -3	14.51±0.59	0.143±0.008	21.58±0.68	21.58±0.68	0.222±0.004	15.78±1.29	15.78±1.29	0.162±0.015	21.34±0.92	0.242±0.001	0.242±0.001	33.68±1.53	0.627±0.052	0.627±0.052	0.627±0.052
ω -6	16.24±1.84	0.159±0.010	16.24±1.61	16.24±1.61	0.167±0.015	12.17±0.14	12.17±0.14	0.125±0.000	12.12±1.85	0.137±0.014	0.137±0.014	12.93±0.48	0.241±0.025	0.241±0.025	0.241±0.025
ω -3/ω -6	0.90±0.08a	0.090±0.008	1.33±0.09b	1.33±0.09b	1.335±0.09	1.30±0.12b	1.30±0.12b	1.30±0.12	1.78±0.18c	1.78±0.18	1.78±0.18	2.61±0.16d	2.61±0.16	2.61±0.16	2.61±0.16
DHA	6.68±0.3a	0.065±0.008	9.68±0.58e	9.68±0.58e	0.099±0.001	6.93±0.37b	6.93±0.37b	0.071±0.003	7.63±0.44c	0.085±0.002	0.085±0.002	8.35±0.47d	0.156±0.019	0.156±0.019	0.156±0.019
DHA/EPA	13.36±1.2a	13.55±1.16	18.61±1.8b	18.61±1.8b	18.61±1.81	25.66±2.5c	25.66±2.5c	25.75±2.52	28.26±1.5d	9.90±0.50	9.90±0.50	37.95±1.7e	37.95±1.75	37.95±1.75	37.95±1.75
DHA/ARA	4.12±0.38a	±	10.19±1.1b	10.19±1.1b	±	23.90±1.4e	23.90±1.4e	±	19.07±1.4d	±	±	17.39±1.5c	±	±	±
EPA/ARA	0.31±0.02	±	0.55±0.03	0.55±0.03	±	0.93±0.07	0.93±0.07	±	1.54±0.12	±	±	0.46±0.02	±	±	±
Total A.G.	±	0.987±0.08a	±	±	1.029±0.03b	±	±	1.028±0.01b	±	1.138±0.05c	±	±	1.862±0.12d	1.862±0.12d	1.862±0.12d
Total Lípidos	±	4.00±0.24	±	±	4.59±0.57	±	±	4.77±0.44	±	6.45±0.22	±	±	8.62±0.79	8.62±0.79	8.62±0.79

A.G. ácido graso, DHA, docosahexaenoico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=5). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0,05)

Capítulo 7

Evaluación del efecto de los medios de cultivo ***Algal Alta Rendimiento (AAR)*** y ***Algal Incremento Concentración EPA (AEPA)*** en diferentes concentraciones de nitrógeno, sobre la generación de biomasa, composición bioquímica, e incorporación elemental de ***Phaeodactylum tricornutum*** en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.

Introducción

En los últimos años un gran interés se ha centrado sobre la producción y aplicación farmacéutica y en acuicultura del ácido eicosapentaenoico (EPA). Sin embargo hasta ahora, los estudios publicados solo se han limitado a determinar el contenido de EPA en microorganismos y la influencia de diferentes parámetros físicos de cultivo en condiciones de laboratorio. Asimismo, la investigación se ha realizado sobre la influencia de los parámetros de cultivo en la productividad de la biomasa y por modificación individual de dichos parámetros, sin tomar en cuenta la influencia de la complejidad mineral y su adecuada concentración en la óptima nutrición celular para producción de biomoléculas de importancia.

Entre las microalgas fotosintéticas *Phaeodactylum tricornutum* es una de las más estudiadas. Esta diatomea muestra altas tasas de crecimiento bajo condiciones óptimas y es una fuente potencial de EPA (Molina Grima, et al., 1994b; 2001). El empleo de esta microalga en acuicultura es muy controversial, debido a que en condiciones de cultivo puede presentar muy importantes variaciones en la composición bioquímica de las células y por tanto en su valor nutritivo (Reis et al., 1996; Albentosa et al., 1996)

Diseño experimental

Se utilizó a la microalga *Phaeodactylum tricornutum* para cultivarla en régimen discontinuo y semicontinuo en minifotobiorreactores cilindro cónicos con 80 mL de volumen de cultivo; empleando y comparando los siguientes medios de cultivo: "Algal Industrial" (**AIPT=ALGAL**) (Fábregas et al., 1984), Algal Alto Rendimiento (**AARPt**) (desarrollado en el capítulo 5, en base a los resultados del capítulo 1) ambos con una concentración de nutrientes 4 mg át. N.L⁻¹ en forma de NaNO₃, así como el medio denominado "Algal Incremento de la Concentración EPA" (**AEPA**) (desarrollado en el capítulo 5, en base a los resultados del capítulo 1) con una concentración de nutrientes 4, 8 y 16 mg át. N.L⁻¹ en forma de NaNO₃. Las condiciones de cultivo se especifican en la sección de Materiales y Métodos. Los cultivos ($n=5$) se sometieron a una tasa de renovación del 30%. Se empleó una densidad inicial de $5,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹. Los cultivos se dejaron llegar hasta el final de la fase logarítmica. Se consideró que alcanzó la fase estacionaria cuando la densidad celular en cultivo se mantuvo constante durante tres días consecutivos como mínimo, finalizando el cultivo discontinuo, evalúese la biomasa generada y cosechese de 5 a 10 mL de biomasa microalgal por centrifugación, para el análisis correspondiente de proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, incorporación de metales; y filtración de biomasa microalgal, para determinación de peso seco, cenizas y materia orgánica por célula de *Phaeodactylum tricornutum*, en base a las técnicas descritas en la sección de Materiales y Métodos.

Resultados y discusión.

La densidad celular de *Phaeodactylum tricornutum* ($10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$), cultivada con los diferentes medios de cultivo y concentraciones ya citadas, una vez que llegaron al final de la fase estacionaria de crecimiento, mostraron los siguientes valores de biomasa celular en estado de equilibrio al día 10 (T_{10}) de cultivo discontinuo (CD): **AIPt4**($52,50 \pm 4,10$), **AARPt4**($64,00 \pm 5,70$), **AEPA4**($69,30 \pm 5,65$), **AEPA8**($81,25 \pm 7,65$), **AEPA16**($98,25 \pm 8,60$), ver *figura 1a*; indicándonos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo mencionadas ($p<0,05$) (*figura 1b*). Observándose además que el incremento de la concentración de nutrientes en el medio de cultivo **AEPA** mostró una fuerte correlación r^2 de 0,99 con ajuste a una tendencia lineal positiva en la generación de biomasa (*figura 1c*). Otero, 1994 con la misma especie empleando el medio de cultivo "ALGAL" con una concentración de nutrientes 4, 8 y 16mM llegó a obtener densidades de 56,27, 81,60 y $115,00 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$ respectivamente, donde solo la concentración 16mM mostró sustancialmente una mayor densidad celular comparada con la misma concentración del presente estudio. Yongmanitchai and Ward, 1991, Molina Grima *et al.*, 1994, 1995 mencionan que independientemente de las condiciones fisicoquímicas de cultivo es importante también considerar el tipo de cepa a emplear ya que estos mencionan que altas productividades es posible obtenerlas empleando la cepa *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640, aunque la empleada en el presente estudio aislada por Fábregas, 1982 de la ría de Arosa a demostrado altas productividades en diferentes sistemas de cultivo.

Expresar que en el capítulo 1 de la presente disertación, al incluir por separado con diferente concentración a los elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en el medio "ALGAL" solo se obtuvieron densidades celulares máximas en CD en torno a $45\text{--}56 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$

Se obtuvieron tasas máximas de crecimiento de: 0,94, 1,15, 1,17, 1,52 y $1,48 \text{ div. día}^{-1}$ para **AIPt4**, **AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16** respectivamente (*tabla 1*).

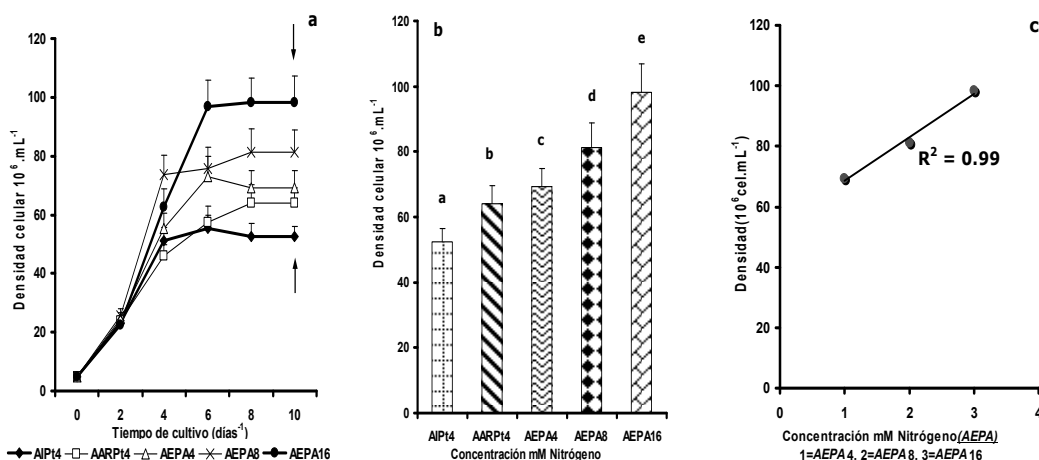


Figura 1.- Densidad celular de *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo discontinuo con diferentes medios de cultivo. Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

La densidad celular de estabilización en cultivo semicontinuo (CS) (10^6cel.mL^{-1}) respecto al cultivo discontinuo (CD) para cada medio de cultivo probado, expresó diferencias con la tasa de renovación del 30%, de modo que medios como el **AIPT4**, **AARPt4** decrecieron su concentración un 13,14 ($45,60 \pm 4,80$) y 21,72% ($50,10 \pm 4,20$) respectivamente, en tanto que las recetas **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16** mermaron su concentración celular un 30,22 ($48,36 \pm 3,70$), 12,86 ($70,80 \pm 6,90$) y 30,18 ($68,60 \pm 6,30$) comparativamente (*figura 2a*), alcanzando el estado de equilibrio al día 30 de cultivo; existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo ($p<0,05$) (*figura 2a*). Otero, 1994, con el medio de cultivo **AIPT=ALGAL** con concentración de nutrientes 4, 8 y 16mM y una tasa de renovación del 30% obtuvo solo densidades en CS de 42,37, 33,75 y $32,93 \times 10^6 \text{cel.mL}^{-1}$.

El incremento de la concentración de nutrientes en el medio de cultivo **AEPA** reveló una fuerte correlación r^2 de 1 con ajuste a una tendencia polinomial negativa, en la generación de biomasa (*figura 2b*) en cultivo semicontinuo. La mayoría de los ingredientes minerales en el medio de cultivo tienen influencia directa sobre varios procesos fisiológicos y bioquímicos; además de inferir en gran variedad de funciones fotosintéticas.

La interacción de los diferentes medios de cultivo en *Phaeodactylum tricornutum* mostró una productividad celular ($10^9 \text{cél.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$) de 13,68(**AIPT4**), 15,03(**AARPt4**), 14,51(**AEPA4**), 21,24(**AEPA8**) y 20,58(**AEPA16**) (ver *figura 2c*). Productividades que fueron superiores a las reportadas por Thomas *et al.*, 1984; Otero, 1994 con la misma diatomea que el presente estudio, con $12,7 \times 10^9 \text{cél.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$, y empleado el ultimo autor el medio de cultivo "ALGAL"; por otra parte Herrero *et al.*, 1991 en cultivo masivo solo obtiene una productividad de $6,26 \times 10^9 \text{cél.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$, Marsot *et al.*, 1987, 1991 en un sistema continuo en diálisis y empleando agua enriquecida con nutrientes, solo obtiene $3,5 \times 10^9 \text{cél.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$, Laing, 1985 en un sistema semicontinuo de 200 L consigue $3,45 \times 10^9 \text{cél.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$. En el capítulo 1 de la presente disertación en base a los diferentes elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en diferente concentración, incluidos por separado en la reconstitución del medio de cultivo "ALGAL" fue posible obtener en *Phaeodactylum tricornutum* productividades en torno a los 5 y $16 \times 10^9 \text{cél.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$; productividades que fueron todavía mejoradas mediante la complejidad de elementos y concentraciones optimas en los nuevos medios de cultivo ensayados.

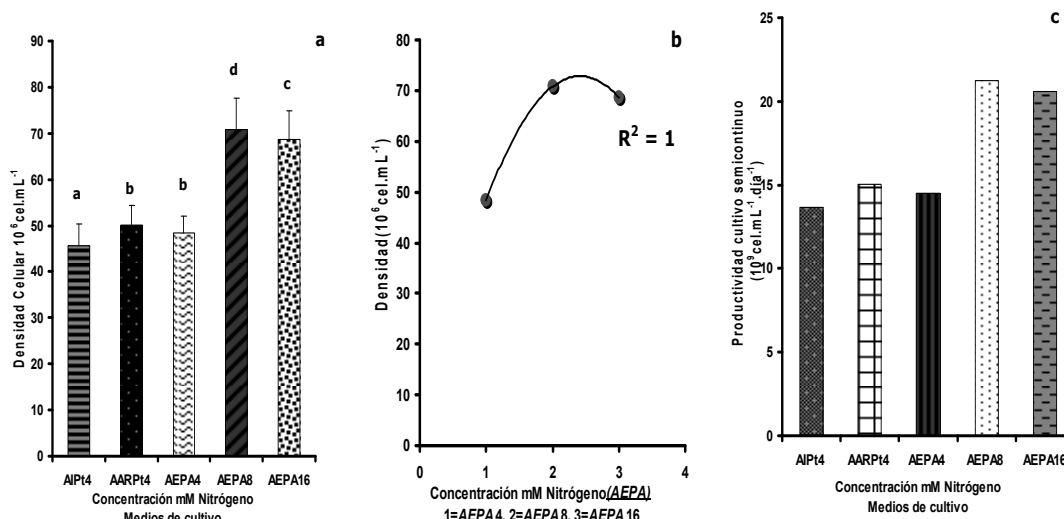


Figura 2.- (a) Máxima densidad celular en cultivo semicontinuo para *Phaeodactylum tricornutum* con diferentes medios de cultivo, **(b)** Correlación AEPA4,8,16 mM **(c)** Productividad. Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existen diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

Se cuantifico la cantidad de nitrógeno residual (mM), al final de la etapa de estabilización de los cultivos en semicontinuo, mostrándose valores de 0,16(**AIPT4**), 0,11(**AARPT4**), 0,12(**AEPA4**), 0,31(**AEPA8**), 0,99(**AEPA16**) ver *tabla 1*. La fluctuación del nitrógeno (N) residual entre las concentraciones de los medios de cultivo, correspondió con la densidad celular generada (*tablas 1*), es decir a mayor densidad celular menor cantidad de nitrógeno residual o mejor dicho conversión de nitrato en nitrógeno intracelular (Otero, 1994, Otero *et al.*,1998). Mencionar que el nitrógeno residual cuantificado en los medios de cultivo de *Phaeodactylum tricornutum* con las concentraciones optimas de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en la reconstitución del medio “ALGAL” (capítulo 1) fue detectado entre 0 y 2,92mM en cultivo semicontinuo, lo que nos indicaría que el sinergismo de los ingredientes elementales en concentraciones optimas en los nuevos medios de cultivo y dados los requerimientos nutricionales de la célula es que fueron cubiertos, promoviendo por tanto una adecuada división celular para la generación de biomasa utilizando por tanto el máximo de nitrógeno disponible.

Se observaron los siguientes valores de cuota celular de nitrógeno Q_N y carbono Q_C (pg.cel^{-1}), para *Phaeodactylum tricornutum* con los diferentes medios de cultivo probados **AIPT4** (1,23-13,03), **AARPT4** (1,28-13,69), **AEPA4** (1,29-12,84), **AEPA8** (1,61-12,63), **AEPA16** (2,91-15,46) (*tabla 1* y *figura 3*) valores que nos indicaron la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las concentraciones de cultivo ($p<0,05$) para ambas cuotas celulares, uno y otro valores como se puede observar para los nuevos medios de cultivo probados, son superiores al medio control (**AIPT4=ALGAL**) a excepción de el medio **AEPA4**; base sobre el cual fueron concebidas las nuevas recetas de cultivo. Demostrar que un incremento en la concentración de nutrientes 4, 8 y 16mM en el medio **AEPA** promueve un aumento de Q_N comportamiento que corrobora Otero, 1994 en cultivos en ciclostato. Los valores de Q_C reportados en este estudio son superiores a los reportados por Otero, 1994 con la misma diatomea, el medio de cultivo “ALGAL”, una tasa de

Capítulo 7: Evaluación del efecto de los medios de cultivo **Algal Alto Rendimiento (AAR)** y **Algal Incremento Concentración EPA (AEPA)** en diferentes concentraciones de nitrógeno, sobre la generación de biomasa, composición bioquímica, e incorporación elemental de ***Phaeodactylum tricornutum***.

renovación del 30%, en cultivos en ciclostato y concentración de nutrientes 4, 8 y 16mM (8,43, 10,80 y 10,72pg.cel⁻¹ respectivamente), en tanto que con respecto a la Q_N reporta valores de 1,34, 1,92 y 1,98; en donde nuestros valores estuvieron por debajo, excepto para la microalga cultivada con el medio de cultivo **AEPA16** (2,91 pg.cel⁻¹), el mismo autor menciona que con una concentración 16mM y una tasa de renovación del 10% es posible obtener una Q_N máxima de 2,31pg.cel⁻¹, valor máximo que también a sido descrito entre 2,13 y 2,30 pg.cel⁻¹ por Osborne and Geider, 1986; Thompson *et al.*,1990 en cultivos masivos y en quimiostato. Señalar que las Q_N y Q_C obtenidas en el capítulo 1 de la presente disertación con *Phaeodactylum tricornutum* con los elementos Ca²⁺, Mg²⁺, Se²⁻, Si⁴⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, y S²⁻ en concentración óptima en la reconstitución parcial del medio "ALGAL", mostraron estar por debajo de los obtenidos con las formulaciones **AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16**.

Obtuvo se la siguiente relación C:N para la microalga cultivada con los diferentes medios de cultivo **AIPT4** (9,09), **AARPt4** (9,20), **AEPA4** (8,52), **AEPA8** (6,72), **AEPA16** (4,55) (*tabla 1* y *figura 3*) resultados que nos revelaron la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo ($p<0,05$). Destacar que tal relación en el medio de cultivo denominado **AEPA** en las concentraciones 4, 8 y 16mM de nutrientes, no mostró una evolución lineal positiva y si negativa (*tabla 1*) como podría esperarse dada la concentración de nutrientes, como también no sucedió con la tasa máxima de crecimiento (*tabla 1*) reflejo de la densidad celular en CS; así mismo la conversión de nitrógeno en el medio, en nitrógeno intracelular es alta dados los valores de nitrógeno residual antes reportados (*tabla 1*); lo que apoyaría la hipótesis de que el nitrógeno no es el único de los nutrientes que limita o coadyuva el crecimiento celular en cultivo semicontinuo (Laws and Bannister, 1980) con las formulaciones **AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16**, existiendo por lo tanto interacción entre la complejidad de los nutrientes presentes.

Los valores de C:N para *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con **AARPt4** (9,20) **AEPA4** (8,52) y **AEPA8** (6,72) son mayores a los reportados por Otero, 1994 con tal diatomea en cultivos en ciclostato, donde a una tasa de renovación del 30% igual a la del presente estudio, demostró relaciones de 7,36, 6,53 y 6,30 con concentración de nutrientes 4, 8 y 16mM. La formulación **AEPA** con concentración de nutrientes 4, 8 y 16mM en el cultivo de *Phaeodactylum tricornutum* provoca un descenso de la relación C:N (*tabla 1*) al respecto Otero, 1994 menciona que tal relación también disminuye con la tasa de renovación del cultivo. Los valores descritos en el presente estudio (*tabla 1*) con excepción de la condición **AEPA16** (4,55), son mayores en el rango de 9,09-6,72, a los reportados por Osborne and Geider, 1986, con respecto a la relación Redfield (C:N 6,6), valores con los cuales se considera, no existe limitación por nutrientes (Goldman *et al.*,1979; Goldman and Peavey, 1979, Goldman *et al.*,1986) lo que nos indicaría además la proximidad de la máxima tasa de crecimiento (McCarthy, 1980) ver *tabla 1*; sin embargo un exceso aun mayor de nutrientes influye sobre una disminución de tal relación como ocurrió con la condición **AEPA16** (4,55) (*figura 3*). Los valores de C:N dependerán por tanto de las condiciones de saturación por nitrógeno, la complejidad y concentración optima de los elementos que constituyen a cada uno de los nuevos medios de cultivo probados en cultivos en

Capítulo 7: Evaluación del efecto de los medios de cultivo **Algal Alto Rendimiento (AAR)** y **Algal Incremento Concentración EPA (AEPA)** en diferentes concentraciones de nitrógeno, sobre la generación de biomasa, composición bioquímica, e incorporación elemental de ***Phaeodactylum tricornutum***.

semicontinuo, con regimenes de iluminación circadiana (12:12h luz:oscuridad) (Otero et al.,1998).

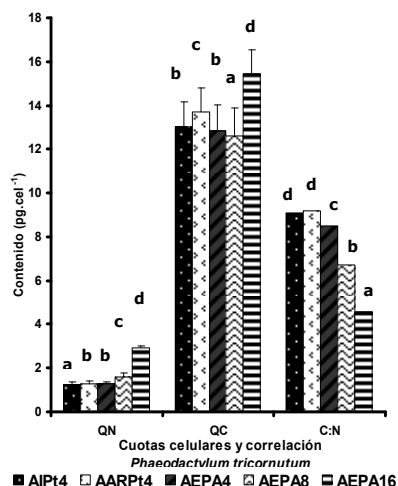


Figura 3.- Cuota celular de nitrógeno Q_N , carbono Q_C y relación C:N respecto a los diferentes medios de cultivo en *Phaeodactylum tricornutum*. Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

La estructura bioquímica celular (proteínas, carbohidratos y lípidos) de *Phaeodactylum tricornutum*, vario considerablemente con respecto a las formulaciones de cultivo empleadas y concentración [mM] de estas, existiendo en el comportamiento de los tres combustibles bioquímicos, diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo ($p<0,05$) (tabla 1 y figura 4a). En tanto que el medio de cultivo **AEPA** en la concentración de nutrientes 4, 8 y 16 mM la evolución del contenido de proteína mostró un coeficiente de correlación r^2 de 0,95 (con ajuste a una tendencia lineal positiva), derivado de Q_N (tablas 1), en tanto que con respecto a los carbohidratos un $r^2=0,99$ (con ajuste a una tendencia lineal negativa) derivado de Q_C , y en el caso de los lípidos un r^2 de 0,99 (con ajuste a una tendencia lineal positiva) (figuras 4b).

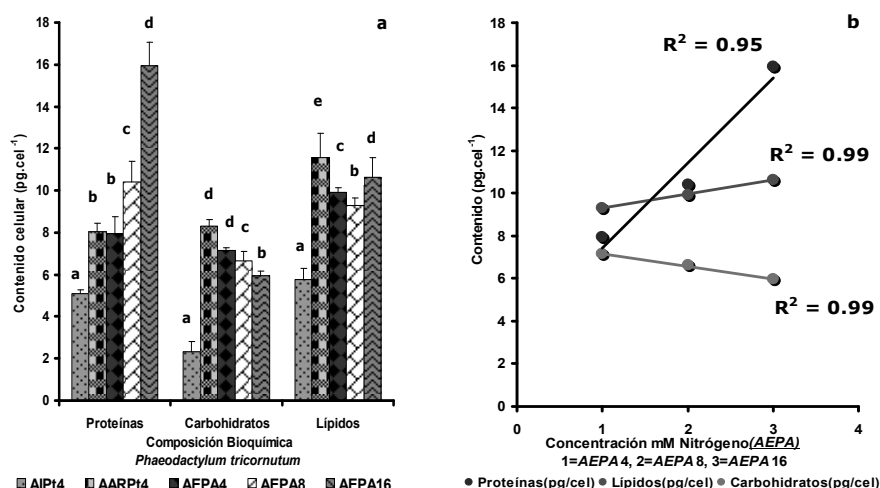


Figura 4. (a) Contenido celular (pg.cel^{-1}) de proteínas, carbohidratos y lípidos, respecto a los diferentes medios de cultivo en *Phaeodactylum tricornutum*. **(b)** Coeficientes de correlación **AEPA4,8,16**. Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

Los registros de contenido proteico celular en cultivo semicontinuo fue influenciado por las formulaciones probadas; los cuales oscilaron entre 8,04 y 15,94 pg.cel⁻¹ (*tabla 1 y figura 4a*) donde las recetas **AARPt4** (8,04), **AEPA4** (7,94), **AEPA8** (10,41), y **AEPA16** (15,94) mostraron un mejor rendimiento proteico celular con respecto al medio **AIPt4=ALGAL** (5,08). Observándose además, que la formulación **AEPA** con concentración de nutrientes 4, 8 y 16mM incrementa casi linealmente tal rendimiento proteico. Otero, 1994 en cultivos en ciclostato con las mismas concentraciones antes mencionadas en el medio de cultivo "ALGAL" y una tasa de renovación del 30% obtiene 7,75, 11,15 y 11,51 pg.cel⁻¹, valores por debajo de los descritos en este estudio con excepción de la concentración 8mM de nutrientes. Indicando además, que el contenido máximo celular de proteína, derivado de Q_N, fue de 13,22 pg.cel⁻¹ obtenido en cultivos con 16mM de nutrientes y un tasa de renovación del 10%, resultados aun mas bajos obtenidos con la misma especie, son los reportados por Herrero *et al.*, 1991 con 5,21pg.cel⁻¹ en cultivos masivos. Otros autores como Parsons *et al.*, 1961; Fernández-Reiriz *et al.*, 1989 obtienen máximas cantidades de 7,17 y 4,81 pg.cel⁻¹ respectivamente.

Indicar que en el capítulo 1 de la presente disertación, una vez deducidas las concentraciones optimas por separado, de los elementos Ca²⁺, Mg²⁺, Se²⁻, Si⁴⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, y S²⁻, en la reconstitución parcial de la formulación "ALGAL" y con las cuales solo se obtuvo un rendimiento de proteína en el rango de 2,25-9,63 pg.cel⁻¹, rango inferior al obtenido cultivando a *Phaeodactylum tricornutum* con los nuevos medios **AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16**. Piorreck and Phol, 1984; Kaixian and Borowitzka, 1992; Fernández Sevilla, 1995, mencionan que tiempos de residencia cortos de nutrientes y en suma su importancia fisiológica es que promoverán la formación de proteínas, combustible rápidamente empleado en el crecimiento y división celular por lo que es de esperarse los valores de este estudio en cultivo semicontinuo, en adición a la complejidad y concentración de los elementos, que dependiendo de esta, poseerán una amplia implicación en la síntesis de proteínas como mencionan varios autores (O'Kelley, 1974; McCarthy, 1980; Kaplan *et al.*, 1990).

Se ha sugerido que los aminoácidos libres, una fracción importante desde el punto de vista del valor nutricional proteico de las microalgas, sirven como almacenamiento de nitrógeno en las diatomeas, proponiéndose al contenido en aminoácidos libres como indicador del estado nutricional celular (Admiraal *et al.*, 1986). El papel de los aminoácidos libres como almacenadores de nitrógeno ha sido demostrado en otras especies microalgales (Dortch *et al.*, 1984; Davidson *et al.*, 1992), incluyendo diatomeas (Dortch, 1982).

El contenido de carbohidratos celulares dependió de la receta de cultivo empleada, fluctuando entre 5,96 y 8,29 pg.cel⁻¹ (*tabla 1*) donde las recetas de cultivo **AARPt4**(8,29), **AEPA4**(7,15), **AEPA8**(6,64), y **AEPA16**(5,96) mostraron un mejor rendimiento en carbohidratos celulares con respecto a la formulación **AIPt4=ALGAL**(2,32). Indicar que el incremento de nutrientes con el medio de cultivo **AEPA** hizo decrecer la cantidad de dicho

Capítulo 7: Evaluación del efecto de los medios de cultivo **Algal Alto Rendimiento (AAR) y Algal Incremento Concentración EPA (AEPA)** en diferentes concentraciones de nitrógeno, sobre la generación de biomasa, composición bioquímica, e incorporación elemental de ***Phaeodactylum tricornutum***.

combustible celular. Prestar atención que en el rendimiento de CHOs descrito para los elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en la reconstitución parcial del medio "ALGAL" (capítulo 1), nos indico un rango entre 1,00 y 6,00 pg.cel^{-1} que es inferior al obtenido cultivando a la microalga con los nuevos medios **AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16**; sin embargo con la concentración óptima de azufre 0,1mM se obtuvo un valor de 7,49 pg.cel^{-1} . Los valores de CHOs descritos con la mayoría de los medios probados en el presente estudio, superan los rendimientos reportados por Otero, 1994, en sus estudios con la misma diatomea, tasa de renovación del 30%, con el medio de cultivo "ALGAL" y concentración de nutrientes 4, 8 y 16mM con 4,36, 4,48 y 4,46 pg.cel^{-1} .

En continuación, el contenido lipídico celular demostró con respecto a los medios de cultivo probados, valores en el rango de 9,31 y 11,56 pg.cel^{-1} ; donde las recetas de cultivo **AARPt4**(11,56), **AEPA4**(9,31), **AEPA8**(9,93), y **AEPA16**(10,62) revelaron un mejor rendimiento lipídico celular con respecto al medio **AIPt4=ALGAL**(5,76). Decir que el incremento de nutrientes con la receta de cultivo **AEPA** (4, 8, y 16mM), aumentó la cantidad de dicho combustible celular, tendencia similar fue demostrada por Otero, 1994. Mencionar que en el capítulo 1 de la presente disertación se observó una oscilación en el rendimiento lipídico celular de 3,41-5,55 pg.cel^{-1} con respecto a los elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} , rango que es inferior al obtenido cultivando a la microalga con los nuevas formulaciones. Los valores descritos en el presente estudio se encuentran por arriba de los reportados por Otero, 1994 en cultivos en ciclostato, en las condiciones antes descritas con valores de 3,19, 4,13 y 4,69 pg.cel^{-1} , sin embargo menciona que un máximo contenido lipídico puede ser obtenido en sistema de ciclostato con 7,47 pg.cel^{-1} en condiciones de 1mM nutrientes-algal, y una tasa de renovación del 10%. Otros autores encuentran un contenido máximo en un sistema de turbidostato en diálisis de 2,5 pg.cel^{-1} . Thompson *et al.*,1990 en un sistema de cultivo semicontinuo obtiene solo 5,36 pg.cel^{-1} con tasa de crecimiento máxima. Parsons *et al.*,1961; Fernández-Reiríz *et al.*,1989; Herrero *et al.*,1991, en cultivo masivo obtuvieron solo 1,43, 1,83 y 6,51 pg.cel^{-1} respectivamente. Los valores del contenido lípido celular son debidos además por la característica que posee *Phaeodactylum tricornutum*; diatomea que emplea a los lípidos como el principal producto de almacenamiento de energía (Reis *et al.*,1996; Mirón *et al.*,2002), produciendo una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, que incluyen considerables concentraciones de EPA (Arao *et al.*,1987; Dunstan *et al.*,1994). Previos estudios han demostrado que el contenido lipídico de algunas microalgas puede ser incrementado por varias condiciones de cultivo dentro de las cuales destaca una alta concentración de hierro (Liu *et al.*,2008).

Otero, 1994 menciona obtener en sus condiciones de cultivo células de *Phaeodactylum tricornutum* con un peso orgánico de 15,31, 19,77 y 20,6 pg.cel^{-1} , valores por debajo de los obtenidos con la misma concentración de nutrientes en nuestro estudio con 25,02, 26,36 y 32,52 pg.cel^{-1} (tabla 1), por lo cual se considera que cultivar a dicha diatomea con los nuevos medios hace más eficiente la obtención de biomasa de elevado valor nutritivo.

Los resultados del presente estudio sugieren que cambios en la composición bioquímica celular, fueron influenciados por las nuevas formulaciones ya descritas (capítulo 5), así como la concentración óptima de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en la reconstitución del medio de cultivo "Algal" (Fábregas *et al.*, 1984) (capítulo 1). Los carbohidratos han demostrado ser la reserva energética intermedia en algunas microalgas, debido a que son necesarios cuando la fuente de nitrógeno se ve limitada en la síntesis de lípidos.

Cuando el contenido de proteína se considera como porcentaje de la fracción orgánica (FO) este fluctuó entre el 28,81 y 48,99% (tabla 1 y figura 5). Donde *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con los medios **AIPT4**, **AARPt4** expresó valores de 38,58 y 28,81% respectivamente, en tanto que con el medio **AEPA** con diferente concentración de nutrientes 4, 8 y 16mM, la FO se incremento de manera lineal del 31,74 al 48,99%. Kaixian and Borowitzka, 1992; Molina Grima *et al.*, 1994, indican que la tasa de crecimiento determinara el contenido de proteína el cual puede estar entre un 30 y 50% dependiendo de las condiciones de cultivo. Por lo que respecta a la FO de los lípidos, esta mostró un rango de comportamiento del 17,69 al 41,48% (tabla 1 y figura 5); donde al igual que sucedió en la FO de las proteínas, la FO de los lípidos se incrementó, en respuesta a la mayor adición de nutrientes en el medio de cultivo **AEPA**, en tanto que el medio de cultivo **AARPt4** con un 41,48% mostró ser diferente del 17,69 obtenido con **AIPT4**="ALGAL". En el caso de la FO de los carbohidratos existió marcada diferencia entre los medios **AIPT4** y **AARPt4** con un 43,73 y 29,71% respectivamente; en tanto que dicha FO en el medio **AEPA** con un incremento de nutrientes tiende a disminuir en torno al 28,66-18,33%, dichas tendencias fueron muy similares en el contenido pg.cel^{-1} (tabla 1). Otero, 1994 en sus estudios en cultivo de ciclostato con una tasa de renovación del 30% y el medio de cultivo "ALGAL", en la FO de proteínas obtiene con una concentración de nutrientes 4, 8 y 16mM un rango que decrece de un 50,62 a 34,08%, en tanto que en la FO de lípidos un rango de incremento del 20,84 al 22,72%, finalmente en la FO de los carbohidratos con un decremento de un 28,52 a 21,60.

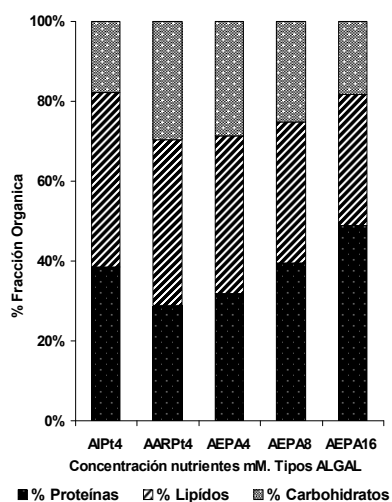


Figura 5.- Fracción orgánica de proteínas, lípidos y carbohidratos, en *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo con diferentes medios de cultivo.

Se obtuvieron diversos valores de contenido calórico celular, empleando los diferentes medios de cultivo, en el rango de $3,90$ y $9,04 \times 10^{-7}$ J.cél⁻¹, existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo ($p<0,05$) (tabla 1); donde las recetas **AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16** en el rango de $7,05$ - $9,04 \times 10^{-7}$ J.cél⁻¹ revelaron generar un superior contenido calórico celular con respecto al medio **AIPT4=ALGAL** ($3,90 \times 10^{-7}$ J.cél⁻¹) (tabla 1), por otra parte el medio de cultivo **AEPA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM), produjo en la biomasa celular un incremento lineal del contenido calórico lo cual se ve reflejado en el valor absoluto de peso orgánico (pg.cel⁻¹) (tabla 1). Los anteriores registros son superiores a los reportados por Otero, 1994 con $3,86$, $5,07$ y $5,37 \times 10^{-7}$ J.cél⁻¹ con el medio de cultivo "ALGAL", tasa de renovación del 30% y concentración de nutrientes 4, 8 y 16mM, en su estudio sobre la modificación de la composición bioquímica de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* en régimen de ciclostato. Los valores de contenido calórico obtenidos con los nuevos medios de cultivo incluso mostraron un mejor rendimiento, comparándolos con la inclusión por separado de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en concentraciones optimas en el medio de cultivo "ALGAL" (capítulo 1) con valores en el rango de $3,37$ - $4,83 \times 10^{-7}$ J.cél⁻¹. Sin duda la inclusión en conjunto de los anteriores elementos en concentraciones adecuadas en cada uno de los diferentes medios de cultivo diseñados (capítulo 5), respondió de diferente forma con las necesidades fisiológico celulares ya descritas por algunos autores (O'Kelley, 1974; McCarthy, 1980; Kaplan et al.,1990). Whyte 1987, menciona que una gran variedad de especies microalgales poseerán un mayor contenido energético en fase estacionaria de crecimiento.

Se halló un rango de variación en el peso seco celular en el orden de $15,62$ - $38,40$ pg.cel⁻¹ en base a los diferentes medios de cultivo probados en *Phaeodactylum tricornutum* (tabla 1 y figura 6a); tal oscilación se correspondió con la evolución de el peso orgánico (proteínas+carbohidratos+lípidos pg.cel⁻¹) en el rango de $13,16$ y $32,52$ pg.cel⁻¹; y por ende con el contenido de materia orgánica por célula (tabla 1), indicándonos la existencia en ambos casos de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$); donde las formulaciones **AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16** en el rango de $29,77$ - $38,40$ pg.cel⁻¹ mostraron generar un mayor peso seco celular con respecto al medio **AIPT4=ALGAL** con $15,62$ pg.cel⁻¹. Observar además que el medio de cultivo **AEPA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8, 16mM) produjo en las células un incremento lineal del peso seco (tabla 1 y figura 6a) con un coeficiente de correlación lineal positivo r^2 de $0,92$ (figura 6b).

En lo referente al contenido celular de cenizas como se puede observar en la tabla 1 y figura 6a, constaron diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre los diferentes medios de experimentación ($p<0,05$) donde las recetas de cultivo **AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16** incidieron en mostrar un mayor contenido celular de cenizas en el rango de $4,75$ - $5,88$ pg.cel⁻¹ con respecto al medio de cultivo **AIPT4=ALGAL** con $2,46$ pg.cel⁻¹. Indicar que

Capítulo 7: Evaluación del efecto de los medios de cultivo **Algal Alto Rendimiento (AAR)** y **Algal Incremento Concentración EPA (AEPA)** en diferentes concentraciones de nitrógeno, sobre la generación de biomasa, composición bioquímica, e incorporación elemental de ***Phaeodactylum tricornutum***.

el contenido celular de cenizas con el medio de cultivo **AEPA** en concentración de nutrientes 4, 8 y 16mM reveló un comportamiento lineal, con un coeficiente de correlación positivo r^2 de 0,94 (figura 6b). La variable ceniza nos indica el tiempo de residencia de los elementos en la célula, vía el cultivo semicontinuo con un 30% de tasa de renovación, induciendo la acumulación de los elementos en el interior celular, con el fin de compensar la elevada presión osmótica del medio de cultivo que es rica en nutrientes minerales. Mencionar que en el capítulo 1 de la presente disertación independiente de la concentración de los elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} , incluidos por separado en el medio de cultivo "ALGAL" (capítulo 1) se demostró un rango de contenido celular de cenizas entre un 2,05 y 4,05 pg.cel^{-1} , valores que se encuentran por debajo de los 4,75-5,88 pg.cel^{-1} logrados con los nuevos medios de cultivo, lo que nos indicaría que además de la compensación por presión osmótica de los elementos intracelularmente, el transporte es aun más activo cuando estos elementos son nutricionalmente esenciales y forman complejos, un tipo de sinergismo entre elementos con nutrientes orgánicos como aminoácidos o proteínas y lípidos (Cid, 1993), lo cual se logro, debido a la nueva complejidad de ingredientes lo que coadyuvo a una mayor acumulación de cenizas en la célula.

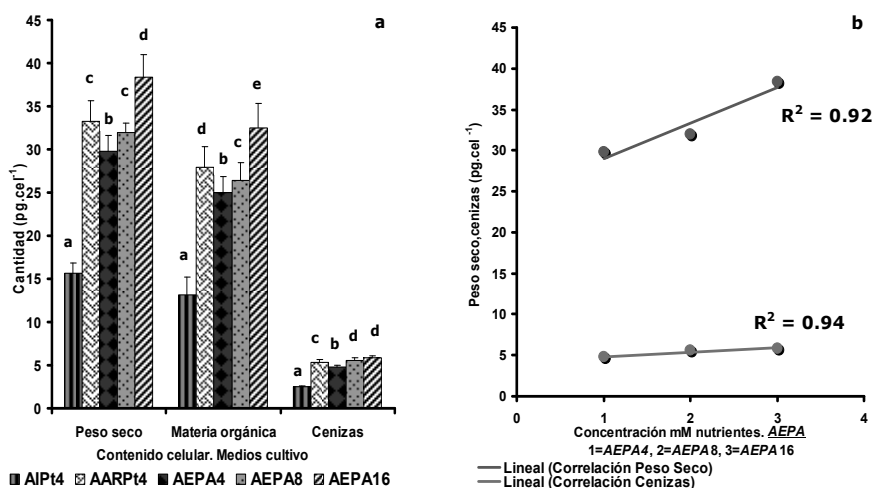


Figura 6.- (a) Contenido celular: peso seco, materia orgánica y cenizas (pg.cel^{-1}) en *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo con respecto a los diferentes medios de cultivo. **(b)** Correlación concentración nutrientes medio de cultivo **AEPA**. Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

Estudios realizados sobre la influencia en la concentración de nutrientes y la tasa de crecimiento sobre el contenido de cenizas contribuyen a poca información clarificadora sobre si un incremento del contenido celular en cenizas podría ser responsable de un descenso en Q_N en condiciones no limitantes (Otero, 1994), siendo que en nuestro estudio fue completamente al contrario ya que Q_N se incremento en respuesta al incremento de las cenizas (tablas 1). Sin embargo algunos autores (Fernández Reiríz *et al.*, 1989) en cultivos masivos han descrito un mayor contenido de cenizas en la fase exponencial de crecimiento que en fase estacionaria, otros más (Thomas *et al.*, 1984; Whyte 1987) no encuentran una tendencia definitiva de la presencia de cenizas con la concentración de nutrientes en cultivo discontinuo o en distintas fases de crecimiento en cultivos masivos.

La incorporación celular en cultivo semicontinuo de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} por *Phaeodactylum tricornutum* en base a los diferentes medios de cultivo probados, se muestra en las *tablas 2-3* y *figuras 6 a-b* y *7a-b*, resultados que nos indicaron la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones experimentadas ($p<0,05$). Demostrar que en el caso del medio de cultivo **AEPA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8, 16mM) se obtuvieron coeficientes de correlación en la incorporación de S^{2-} , Mg^{2+} , Ca^{2+} y Zn^{2+} de $r^2=1$ en todos los casos con ajuste a una tendencia polinomial (*figura 8a*). Por lo que respecta al Se^{2-} mostró una r^2 de 0,91 con ajuste a una tendencia polinomial positiva, elementos como el Si^{4+} , Fe^{3+} y Cu^{2+} se ajustaron a una tendencia lineal positiva con una $r^2=1$, en los 3 casos (*figura 8b*).

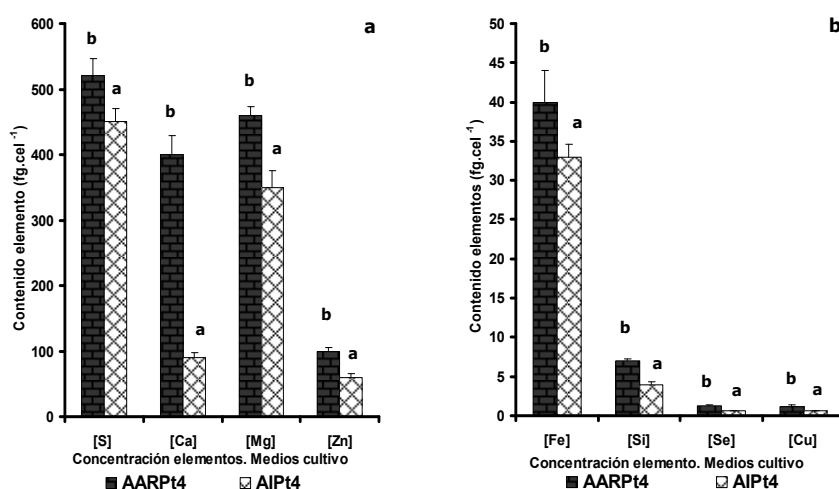


Figura 6.-Incorporación celular de elementos en *Phaeodactylum tricornutum*. en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con AARPt4 y AIPt4: **(a)** S^{2-} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , **(b)** Fe^{3+} , Si^{4+} , Se^{2-} , Cu^{2+} . Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

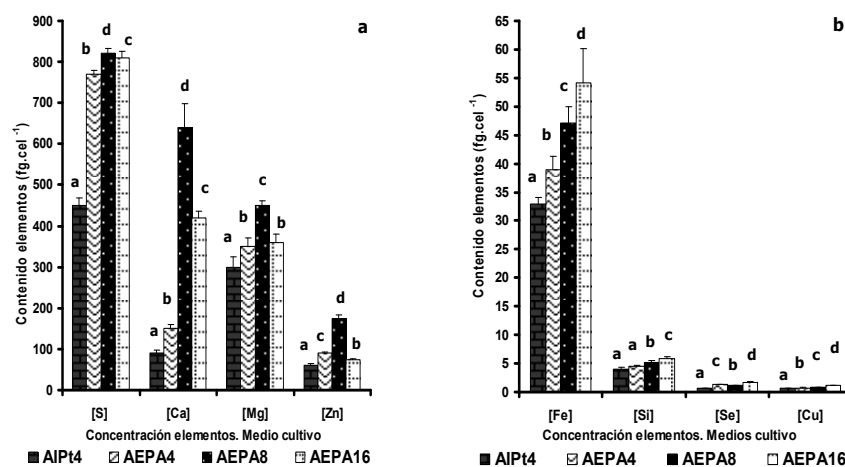


Figura 7.-Incorporación celular de elementos en *Phaeodactylum tricornutum*. en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con AIPt4, AEPA4, 8 y 16mM: **(a)** S^{2-} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , **(b)** Fe^{3+} , Si^{4+} , Se^{2-} , Cu^{2+} . Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

Dicha incorporación de elementos en la célula respecto a los diferentes medios de cultivo, concuerda con la tendencia de el contenido celular de cenizas descrito en la *tabla 1* y *figura 6a*, al respecto Fábregas *et al.*,1996a; Fábregas *et al.*,1996b mencionan que *Phaeodactylum tricornutum* incrementa su volumen celular con la tasa de renovación lo que sugiere un mayor contenido de minerales por otra parte Reboloso Fuentes *et al.*,2000 mencionan que si los minerales son biodisponibles, no tóxicos o antinutricionales serán empleados fisiológicamente y nutricionalmente por las células en adecuado balance de su concentración (Braek *et al.*,1980; Carvalho *et al.*,2006).

Un incremento en la cantidad de los elementos-ingredientes de los medios de cultivo, provoca un descenso del peso orgánico acompañado de variaciones en el peso seco celular (*tabla 1*). En condición de abundancia de nutrientes, las microalgas captan mayores cantidades de elementos del medio, es así que la presión osmótica celular aumenta, dando lugar a una mayor absorción de aniones y cationes (Bhatnagar *et al.*,2002). Darley, 1987, menciona que es debido tal fenómeno a que en los diferentes medios de cultivo la presencia del ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) ayuda ya sea a incrementar la disponibilidad de los elementos presentes o disminuir los niveles tóxicos de los iones libres.

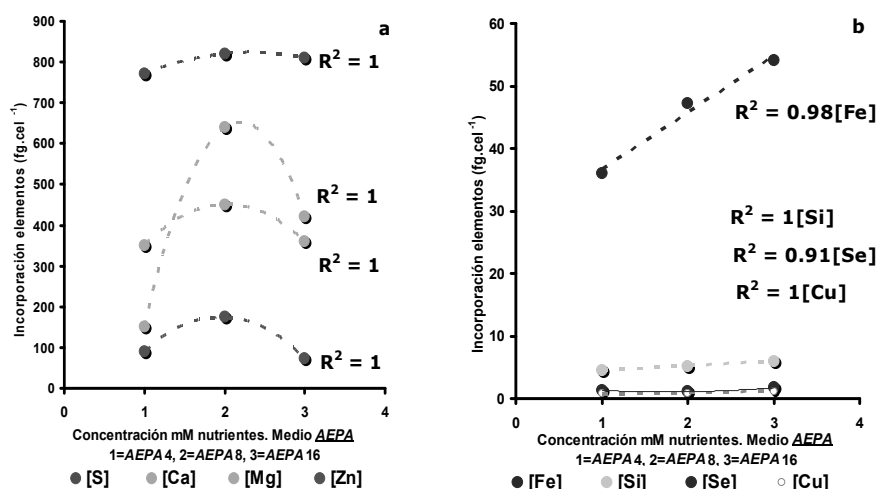


Figura 8.- Coeficientes de correlación en la incorporación celular de elementos en *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con el medio **AEPA**4, 8 y 16mM: **(a)** S²⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, **(b)** Fe³⁺, Si⁴⁺, Se²⁻, Cu²⁺. Media ± SD (n=5).

El decremento del contenido orgánico celular con respecto al peso seco, en *Phaeodactylum tricornutum* en base a las diferentes formulaciones de cultivo empleadas, fue compensado con el contenido de los elementos en las cenizas (*tablas 1*), así mismo conforme se incremento la concentración de nutrientes. Son diversos los mecanismos activos y pasivos para la incorporación de metales por las microalgas (Otero, 1994). La pared celular de las microalgas tienen una gran capacidad para secuestrar o incorporar elementos (Wang *et al.*,1998a). Este hecho es de una importancia especial, ya que las microalgas marinas constituyen el primer eslabón de la cadena trófica marina y por lo tanto, pueden transferir

Capítulo 7: Evaluación del efecto de los medios de cultivo **Algal Alto Rendimiento (AAR) y Algal Incremento Concentración EPA (AEPA)** en diferentes concentraciones de nitrógeno, sobre la generación de biomasa, composición bioquímica, e incorporación elemental de ***Phaeodactylum tricornutum***.

metales a niveles tróficos superiores (Folgar *et al.*, 2009); los cuales son de gran importancia ya que son responsables de una gran cantidad de procesos enzimáticos, antioxidantes y fisiológicos, que coadyuvan a mecanismos formadores de membrana, así como intervenir en procesos de metamorfosis en estadios larvales tempranos.

Los ácidos grasos (AG) más abundantes en *Phaeodactylum tricornutum* una vez cultivada con las diferentes formulaciones **AIPt4=ALGAL, AARPt4, AEPA4, AEPA8 y AEPA16**, fueron el 14:0, 16:0, 16:1(n-7) (Reitan *et al.*, 1994; Zhukova *et al.*, 1998; Ying *et al.*, 2000; Pratoomyot *et al.*, 2005; Jia *et al.*, 2008). Los cuales se presentaron en el rango del 10,49 al 47,19%; valores muy cercanos a los reportados con algunos metales en diferente concentración en el medio de cultivo "ALGAL" en el capítulo 1 de la presente disertación con 5-48%, resultados que concuerdan con los descritos por Rivero-Rodríguez *et al.*, 2007. Los anteriores AG se estimaron en conjunto entre el 67,71 y 85,21% del total de los AG (*tabla 4*), donde los medios **AARPt4, AEPA4, AEPA8 y AEPA16** mostraron, en el rango de 67,71-85,21% ser diferentes del medio **AIPt4=ALGAL** con 71,10%. Sin embargo diversos autores como Heiba *et al.*, 1997; Colombo *et al.*, 2006; Vanitha *et al.*, 2007; Imbs *et al.*, 2007; Jia *et al.*, 2008 describen que tal diatomea posee una composición en promedio del 45% de AG saturados especialmente el ácido mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0) seguido de un 39% de AG monoinsaturados donde destacan el ácido palmitoleico (C16:1n-7) y ácido elaidico (C18:1n-9), así como un 10% de AG poliinsaturados (AGP) especialmente el ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (C20:5n-3). Al respecto en el presente estudio se obtuvieron valores de 10,49-16,26% y 22,26-27,39% para el ácido mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0) respectivamente, en tanto que para el ácido palmitoleico (C16:1n-7) y ácido elaidico (C18:1n-9) resultaron valores de 30,63-47,19% y 1,15-3,26% respectivamente, en el caso del ácido eicosapentaenoico (C20:5n-3) valores entre 6,88 y 12,56%, además de otros AGP como el C16:2n-6 (0,17-1,14), C16:2n-6 (0,79-3,94), C16:3n-3 (1,19-6,15), C20:4n-6 (0,21-0,91), C22:0 (0,90-2,23) (*tabla 4*); oscilación de valores que dependió de las diferentes formulaciones de cultivo empleadas; de modo que se demostró la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$) con respecto a los ácidos grasos totales (AGT) ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) (*tabla 4 y figura 9a*). Resultados que fueron superiores a los encontrados por Otero, 1994 en cultivos en ciclostato, medio de cultivo "ALGAL", concentración de nutrientes 4, 8 y 16mM y tasa de renovación del 30% con valores de 1,69, 2,05 y 1,91 $\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$ respectivamente. Nuestros datos demostraron que aun cuando el contenido de lípidos se incrementa con la concentración de nutrientes no sucede así con el contenido de AGT, el cual disminuye (*tabla 4*). La complejidad elemental así como su adecuada concentración en los nuevos medios de cultivo, nos demuestra cuan versátil suele resultar *Phaeodactylum tricornutum* en el metabolismo de los lípidos y con ello inducir la cantidad de sus ácidos grasos principales (Carvalho *et al.*, 2006; Harwood and Guschina, 2009; Mata *et al.*, 2010).

El contenido de ácidos grasos en la biomasa celular esta influenciado por las condiciones de cultivo. Así que parámetros como la temperatura, irradiancia incidente,

Capítulo 7: Evaluación del efecto de los medios de cultivo **Algal Alto Rendimiento (AAR) y Algal Incremento Concentración EPA (AEPA)** en diferentes concentraciones de nitrógeno, sobre la generación de biomasa, composición bioquímica, e incorporación elemental de ***Phaeodactylum tricornutum***.

disponibilidad de luz, ciclos de luz-oscuridad y una adecuada nutrición mineral, determinará el perfil de ácidos grasos de la biomasa (Bajpai and Bajpai, 1993; Molina Grima *et al.*, 1992, 1993, 1995; Cohen *et al.*, 1995; Mikami and Murata 2003; Los and Murata 2004). El perfil de ácidos grasos de una cepa de microalgas no solo está determinado por su herencia, y puede ser modificado por las diferentes condiciones de crecimiento (Yongmanitchai and Ward, 1991; Laurenco *et al.*, 2002). Entre los diferentes componentes del medio de cultivo, la fuente de nitrógeno (N), así mismo la concentración de ciertos ingredientes pueden provocar cambios importantes en la composición bioquímica de las diferentes especies de microalgas.

Cada formulación de cultivo con base en su constitución elemental y adecuada concentración de ellos es que mostraron diversos grados de evolución respecto a incrementar o decrecer porcentualmente tales AG. Siendo un hecho que en base a la concentración del ácido palmítico (16:0) y palmitoleico (16:1(n-7) es, que fuese posible la elongación y desaturación vía enzimática (Zhukova *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2010) a otros ácidos grasos de cadena más larga, importantes y de concentración apreciable en esta diatomea, como lo fueron el 16:3(n-3), 18:0, 18:1(n-9), 18:1(n-7), 18:2(n-6), y 18:3(n-6) que originaron series de otros AG insaturados de cadena aun más larga como el 20:4(n-6), 20:5(n-3), 22:0 y 22:6(n-3) (tabla 4). Destacando el ácido graso eicosapentaenoico (EPA) (Dunstan *et al.*, 1994; Ying *et al.*, 2000) como precursor de eicosanoides (Dyeberg, 1986); el cual mostró en los medios **AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16** una mayor concentración en el rango de 8,19-12,56% con respecto al medio **AIPT4=ALGAL** 6,88% existiendo por tanto diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$) (tabla 4 y figura 9b). Siron *et al.*, 1989 mencionan que, con y sin adición de fosfatos, es posible obtener 11,2 y 4,9% de EPA, resultados por debajo de los nuestros. Indicar que con el medio **AEPA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8, y 16mM), mostró un coeficiente de correlación $r^2=0,88$, con un ajuste a una tendencia lineal positiva (figura 9c) en el aumento del ácido graso 20:5(n-3) en la célula, y que es el reflejo de la evolución de los lípidos celulares; un incremento del contenido de EPA mediante la concentración de nutrientes ha sido demostrado también en cultivos masivos (Yongmanitchai and Ward, 1991, 1992; Otero *et al.*, 1995) y en ciclostato (Otero, 1994). En tanto que el contenido del ácido graso docosahexaenoico (DHA) mostró un coeficiente de correlación $r^2=1$, con un ajuste a una tendencia polinomial (figura 9c).

El contenido de ácidos grasos fue claramente modificado por los diferentes medios de cultivo. Donde los ácidos grasos saturados mostraron ser mayores sobre los monoinsaturados. Esto puede ser debido a la capacidad de las células para incorporar los diferentes ingredientes de las formulaciones para la producción de lípidos ricos en ácidos grasos neutros como el C14:0, C16:0, y C18:0 (Regnault *et al.*, 1995). Posteriormente estos ácidos saturados son utilizados para síntesis de ácidos grasos poliinsaturados que contrarrestan daños por estrés oxidativo (Harwood, 1988).

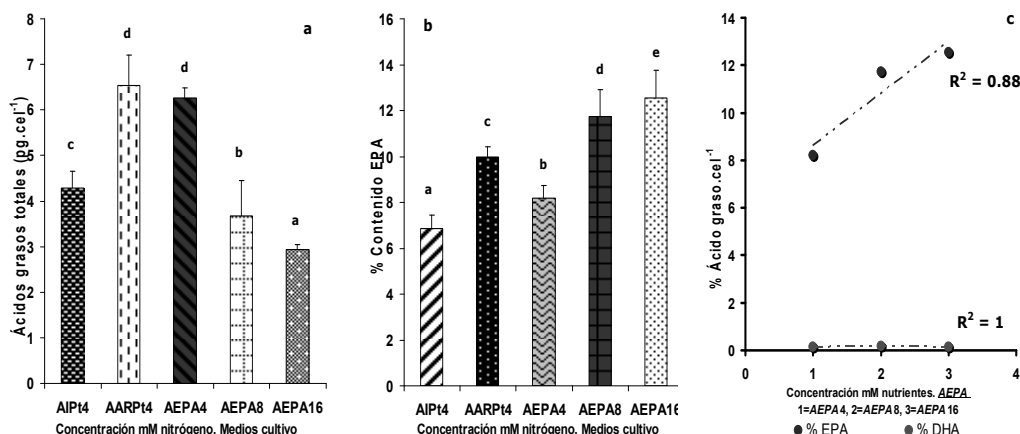


Figura 9. Contenido de Ácidos grasos totales(a), contenido de **EPA** (b) y coeficientes de correlación **EPA** y **DHA** con **AEPA4**, 8 y 16mM (c) por célula de *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con diferentes medios de cultivo. Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

El porcentaje de ácido palmítico (16:0) y palmitoleico (16:1(n-7)) en las células de *Phaeodactylum tricornutum* con respecto a las formulaciones **AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16** se observó con una tendencia a decrecer su concentración en beneficio de incrementar los principales AG poliinsaturados (polares), especialmente el 20:5n-3 (EPA), como se observa en la *tabla 4*, comportamiento similar a sido descrito por Yongmanitchai and Ward, 1991. Tal discusión es corroborada con lo concluido por Ying *et al.*,2000 y Pratoomyot *et al.*,2005, mencionado que el ácido palmítico (16:0) puede variar su presencia celular entre el 13,5% y 26,4% en tanto que el palmitoleico (16:1(n-7)) puede estar presente entre el 21,1% y 46,3%, valores que concuerdan con los resultados del presente estudio. Parrish and Wangersky 1987, mencionan que existen diferencias en la tasa de producción de las distintas clases de lípidos, tanto en la cantidad como en los lípidos producidos bajo condiciones de deficiencia o suficiencia de nutrientes.

Al respecto Parrish and Wangersky 1987 y Siron *et al.*,1989 mencionan que la síntesis intracelular de triglicéridos en *Phaeodactylum tricornutum* se incrementa bajo condiciones de estrés por nitrógeno o condiciones de limitación por fósforo con el incremento de el ácido palmítico (16:0) y palmitoleico (16:1(n-7)) y decremento de lípidos polares específicamente EPA; asociados a membranas.

El máximo contenido de AGT pg.cel⁻¹ que correspondió, del contenido lipídico celular en *Phaeodactylum tricornutum* con las diferentes formulaciones de cultivo fue el siguiente: **AIPt4=ALGAL** (74,48%), **AARPt4** (56,57%), **AEPA4** (67,23%), **AEPA8** (37,06%), **AEPA16** (27,68%). Donde valores de 56,67% y 67,23% mostraron poseer un mejor rendimiento comparado contra un 52,98% obtenido por Otero, 1994 en cultivos en ciclostato con el medio de cultivo ALGAL 4mM y tasa de renovación del 30%; donde además con diferente concentración de nutrientes 4, 8 y 16mM obtiene un decremento del 52,98% al 40,72%, observando en el presente estudio el mismo comportamiento (*tabla 4*). Tal

porcentaje de AGT del contenido lipídico celular se debe a que la producción o generación de los lípidos (Huang *et al.*, 2010); desplaza la formación de lípidos neutros o triglicéridos, los cuales poseen ácidos grasos de baja insaturación por fosfolípidos o galactolípidos (lípidos polares) en la forma de sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) y fosfatidilglicerol (PG) (Goss *et al.*, 2009) y que en *Phaeodactylum tricornutum* y en la mayoría de las diatomeas representan el 40% de los AG poliinsaturados de las series ω -3 y ω -6 (Arao *et al.*, 1987, Mata *et al.*, 2010). Los fosfolípidos son la fuente o sustrato de los ácidos grasos para la formación de eicosanoides, una serie de gran derivación bioactiva, en particular ácidos grasos altamente insaturados (+C20), especialmente el ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6) y el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) (Tocher *et al.*, 2008).

Se hallaron importantes diferencias en el contenido porcentual y $\mu\text{g}\cdot\text{cel}^{-1}$ de los ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGM) y poliinsaturados (AGP), existiendo en todos los casos diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo experimentadas ($p<0,05$) ver *tabla 4* y *figura 10a*. Señalar que en el caso del medio de cultivo **AEPA** con diferentes concentraciones de nutrientes (4, 8 y 16mM) la evolución de dichos ácidos grasos expresó coeficientes de correlación $r^2=0,98$ (AGP), 1,0(AGS), 0,99(AGM), con ajuste a una tendencia lineal positiva en el 1er caso y negativa en el 2do y 3er caso (*figura 10b*). El decremento por tanto de los AGS y los AGM correspondió con el incremento de los AGP ver *figuras 10a* y *tabla 4*.

Recalcar que el contenido de AGP de los medios de cultivo **AEPA8 y AEPA16** expresaron valores superiores en rendimiento con respecto a la condición control **AIPT4=ALGAL** (*figura 10a*). Lin *et al.*, 2007 mencionan que los AGS y los AGM así como los AGP subtotales aumentan de manera exponencial a principios de la fase estacionaria para posteriormente disminuir en la fase estacionaria tardía. Sin embargo se ha observado que cuando la tasa de crecimiento se incrementa, los tiempos de duplicación decrecen y las necesidades para biomoléculas estructurales incrementan, reduciéndose el almacenaje de lípidos neutros. Este efecto produce la reducción del contenido celular en los ácidos grasos saturados y monoinsaturados y un incremento en los poliinsaturados que son los principales constituyentes de las membranas celulares (Kates and Volcani, 1966).

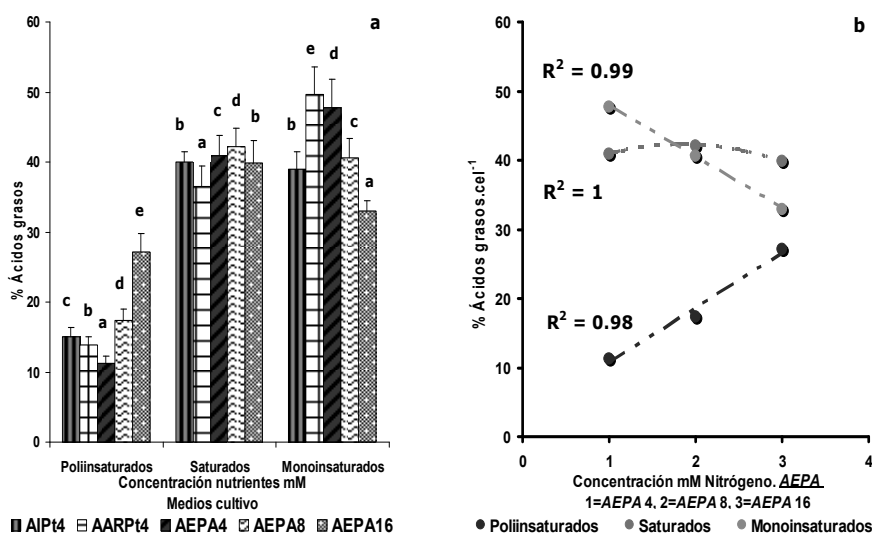


Figura 10. (a) Contenido porcentual de Ácidos grasos por célula de *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficientes de correlación ácidos grasos, medio de cultivo **AEPA**4, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

Los AGP se subdividen en tres familias, mediante las cuales se derivan los procesos de elongación y desaturación mediante las series ω -9, ω -6 y ω -3; de las cuales, las series importantes son la ω -3 y ω -6, así mismo la proporción entre estas dos series es de relevante importancia en el valor energético celular en los siguientes niveles tróficos, por lo que una mayor proporción de los ω -3 es imprescindible en mecanismos formadores de membrana en etapas tempranas de desarrollo larval de organismos marinos.

Es así que las proporciones de ácidos grasos ω -3: ω -6 por célula de *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con los medios **AIPt4=ALGAL**, **AARPt4 AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16** revelaron los siguientes resultados 4,28, 9,04, 9,27, 11,10 y 6,18% comparativamente (tabla 4) por lo tanto se hallaron diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$) (ver figura 11a), pudiendo observarse que los medios **AARPt4 AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16** mostraron un mejor rendimiento con respecto al medio **AIPt4=ALGAL**. Se consiguió un índice de correlación $r^2=1$ (figura 11b) con ajuste a una tendencia polinomial negativa con el medio **AEPA** respecto a dicha proporción, cuando se incremento la concentración de nutrientes (4, 8, y 16 mM). Rivero-Rodríguez *et al.*, 2007 en cultivo de *Phaeodactylum tricornutum* para alimento de larvas de *Crassostrea corteziensis* obtiene una proporción cercana a 10,4%.

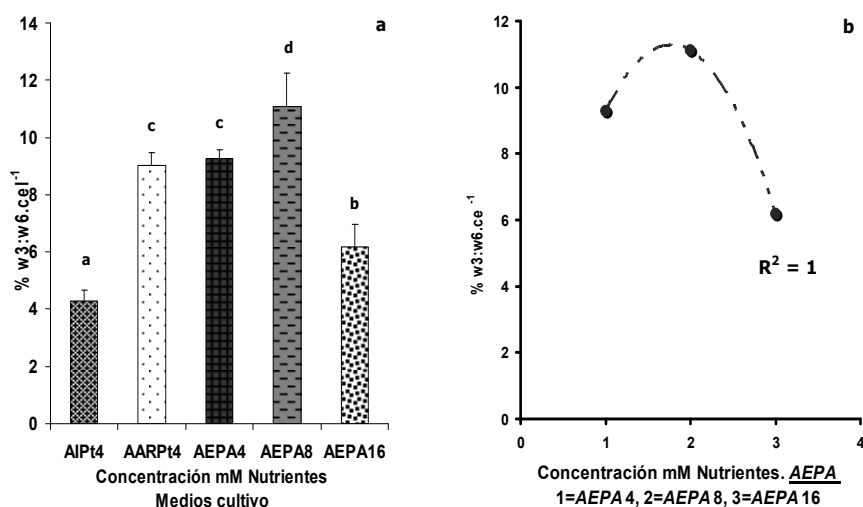


Figura 11. (a) Contenido porcentual de ácidos grasos **w3:w6** por célula de *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficiente de correlación ácidos grasos **w3:w6**, medio de cultivo **AEPA** 4, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existen diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

Un aspecto importante desde el punto de vista nutricional en niveles superiores de la trama trófica alimenticia; es la proporción que existe del total de los ácidos grasos, el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3 EPA) y el ácido araquidónico (20:4n-6 ARA), tal proporción EPA:ARA es muy importante en la alimentación de las primeras etapas de desarrollo larval.

En los peces planos, la metamorfosis y el desarrollo de la pigmentación son controlados a nivel nervioso y neuroendocrinológico. En consecuencia, la producción anormal de eicosanoides en el cerebro como resultado de la alteración de los niveles de ARA y EPA trae consigo graves consecuencias para el desarrollo y la metamorfosis de las larvas de peces planos, incluyendo su anormal pigmentación; por lo que la proporción de EPA que promueve la formación de membranas a nivel celular sobre la proporción de ARA deberá ser siempre superior (Estévez *et al.*,1999).

En el presente ensayo, motivo de la modificación de el medio de cultivo **ALGAL=AIPt4** por la inclusión de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} y Cu^{2+} en concentraciones optimas (capítulo 1), es que se originaron las formulaciones **AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16** (capítulo 5); las cuales se probaron en el cultivo de *Phaeodactylum tricornutum* con la finalidad de probar si era posible modificar la proporción celular de EPA:ARA con respecto al medio **ALGAL=AIPt4**, indicar que fue posible en el rango de 13,80:1% a 39,00:1% por célula como se puede observar en la *tablas 4* con respecto a la proporción 11,46:1% del **ALGAL=AIPt4**; por lo tanto existieron diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación ($p<0,05$) (ver *figura 12a*). Sin embargo como se puede observar en la *tabla 4* y *figura 12b* un incremento en la concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) produce un índice de correlación $r^2=1$ con ajuste a una tendencia polinomial negativa, comportamiento similar observo Otero, 1994 en cultivos en ciclostato con el medio de cultivo algal.

Los valores del presente estudio son importantes en proporción ya que Estévez *et al.*, 2001; Bell *et al.*, 2003 concluyen que una alta incidencia en la mal pigmentación de larvas de peces planos es debida a un pobre enriquecimiento de las presas vivas vía las microalgas con una proporción 0,3:1% de EPA:ARA en contraste con una proporción 4,1:1% de EPA:ARA donde problemas de mal pigmentación en estadios larvales tempranos de peces planos no fueron evidentes, Sargent *et al.*, 1999 mencionan que una proporción 4,2:1 EPA:ARA es esencial para una normal supervivencia, crecimiento, pigmentación y metamorfosis en larvas de rodaballo. Un exceso en la producción de eicosanoides derivados del ácido araquidónico en el cerebro o en la pituitaria de larvas, vía estrés, altera el control neuroendocrino de los procesos implicados en el desarrollo de la pigmentación durante la metamorfosis de peces planos (Estévez *et al.*, 1999).

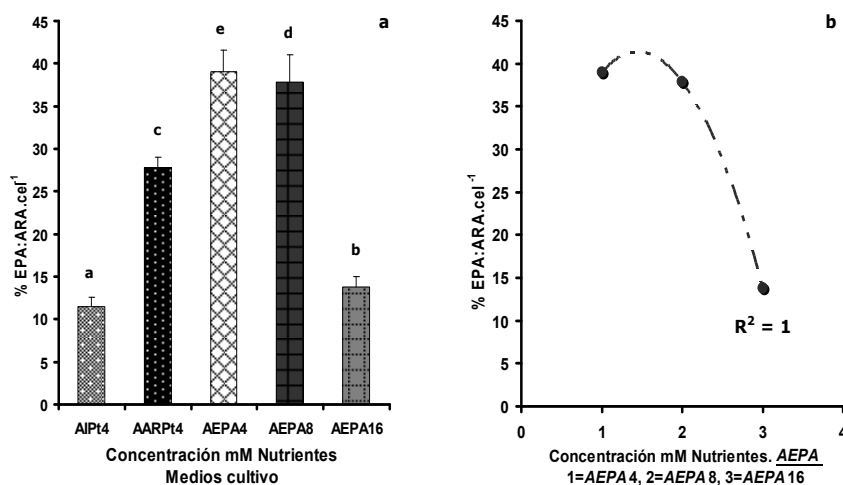


Figura 12. (a) Contenido porcentual de Ácidos grasos **EPA:ARA** por célula de *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficiente de correlación ácidos grasos **EPA:ARA** con el medio de cultivo **AEPA** 4, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=5$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existen diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

El uso de microalgas específicas como fuentes de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), ya sea para su incorporación en la acuicultura o la dieta humana, recibe un creciente interés. El perfil de ácidos grasos intracelular en una especie determinada es posible dentro de ciertos límites manipularlo, ya sea sobre su metabolismo, modulando los parámetros de crecimiento microalgal; o la correlación entre los componentes del medio de cultivo (Carvalho *et al.*, 2006). La nutrición mineral y los efectos de la variación en la composición del medio de cultivo en la producción de ácidos grasos es posible mediante la inclusión en el medio de cultivo de ciertos elementos que además de cumplir con funciones fisiológicas celulares, coadyuvan en la calidad bioquímica de la misma. Comportamientos similares en la cantidad de los ácidos grasos han sido manifestados por Feng *et al.*, 2005; los cuales concluyen que la adición en el medio de cultivo de moléculas orgánicas e inorgánicas mejora la producción de lípidos y ácidos grasos poliinsaturados en microalgas.

Reboloso Fuentes *et al.*, 2000 mencionan que los minerales si son biodisponibles y no tóxicos en la microalgas estas podrían ser utilizadas con fines alimenticios, debido a la cantidad y la diversidad de nutrientes que contienen. Además, de que la composición de la biomasa puede ser modificada por medio de variables operacionales, principalmente mediante el uso de los tiempos de residencia corta para obtener mayores concentraciones de AG poliinsaturados como el EPA, además de un mayor enriquecimiento por proteína.

Capítulo 7: Evaluación del efecto de los medios de cultivo *Algal Alto Rendimiento (AAR)* y *Algal Incremento Concentración EPA (AEPA)* en diferentes concentraciones de nitrógeno, sobre la generación de biomasa, composición bioquímica, e incorporación elemental de *Phaeodactylum tricornutum*.

Tabla 1
Cultivo en semicontinuo de *Phaeodactylum tricornutum* con Algal de Alto Rendimiento (AAR) y Algal de Incremento de la Concentración de EPA (AEPA) (modificado de Fábregas *et al.*, 1984). Concentración de nutrientes 4, 8,16 mg át. N/L, Tasa de renovación 30%.día⁻¹

	AIPt4mM	AARPt4mM	AEPA4mM	AEPA8mM	AEPA16mM
Densidad celular (10 ⁶ cél.mL ⁻¹ std)	45,60a ±4,80	50,10b ±4,20	48,36b ±3,70	70,80d ±6,90	68,60c ±6,30
Productividad (10 ⁹ céls.L ⁻¹ .día ⁻¹)	13,68	15,03	14,51	21,24	20,58
% proteína en F.O.	38,58	28,81	31,74	39,48	48,99
% carboh. en F.O.	43,73	29,71	28,56	25,18	18,33
% lípidos en F.O.	17,69	41,48	39,70	35,34	32,67
Proteína (pg.célula ⁻¹ ± std)	5,08a ±0,18	8,04b ±0,40	7,94b ±0,80	10,41c ±0,37	15,94d ±0,13
Carbohidratos (pg.célula ⁻¹ ± std)	2,32a ±0,48	8,29e ±0,33	7,15d ±0,15	6,64c ±0,44	5,96b ±0,22
Lípidos (pg.célula ⁻¹ ± std)	5,76a ±0,55	11,56e ±0,17	9,31b ±0,21	9,93c ±0,35	10,62d ±0,31
Peso orgánico pg.cel ⁻¹	13,16	27,91	25,02	26,36	32,52
Valor calórico (10 ⁻⁷ J.célula ⁻¹)	3,90a	7,93c	7,05b	7,31b	9,04d
Peso seco µg.mL ⁻¹ ±std	1282,40 ±8,01	1459,73 ±15,52	1372,93 ±33,80	1789,00 ±167,60	2133,87 ±44,40
Peso seco (pg.cel ⁻¹ ±std)	15,62a ±1,19	33,26c ±2,34	29,77b ±1,83	31,93c ±1,16	38,40d ±2,55
Cenizas (pg.cel ⁻¹ ±std)	2,46a ±0,10	5,35c ±0,25	4,75b ±0,30	5,57c ±0,34	5,88d ±0,19
Materia Orgánica (pg.cel ⁻¹ ±std)	13,15a ±2,08	27,91c ±2,37	25,02b ±1,80	26,36c ±0,17	32,50d ±2,79
Nitrógeno Residual mM ± std	0,16 ±0,01	0,11 ±0,02	0,12 ±0,01	0,31 ±0,02	0,99 ±0,06
Tasa Crecimiento Específica (µ)	0,94	1,15	1,17	1,52	1,48
Q _N celular (pg)	1,23a ±0,12	1,28b ±0,15	1,29b ±0,08	1,61c ±0,15	2,91d ±0,09
Q _C celular (pg)	13,03b ±1,15	13,69b ±1,09	12,84a ±1,19	12,63a ±1,27	15,46c ±1,10
RelaciónC:N(átomos)	9,09d	9,20d	8,52c	6,72b	4,55a

Los aquí presentes son la media ± SD (n=3). AIPt = Algal Industrial *Phaeodactylum tricornutum*, AARPt = Algal Máxima Productividad *Phaeodactylum tricornutum*, AEPA4,8,16= Algal Eicosapentaenóico 4,8,16 mM de mg át. N/L.

Tabla 2

Absorción atómica de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en concentraciones óptimas en células de *Phaeodactylum tricornutum* (cultivo semicontinuo) cultivadas con Algal Alto Rendimiento (AARPt) (modificado de Fábregas et al., 1984) y Algal Industrial® (AIPT) (Fábregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.dia⁻¹

Constituyentes <i>AIPT4</i>	Absorción Atómica (fg.célula ⁻¹)	Constituyentes <i>AARPt4</i>	Absorción Atómica (fg.célula ⁻¹)
S(0)mM	450,0a ±19,5	S(0,1)mM	520,0b ±27,15
Ca(0)mM	90,0a ±7,0	Ca(1,0)mM	400,0b ±29,15
Mg(0)mM	350,0a ±25,0	Mg(1,0)mM	460,0b ±13,0
Zn(1,0)mM	60,0a ±5,0	Zn(0,1)mM	100,0b ±6,0
Fe(20,0)mM	33,0a ±1,6	Fe(20,0)mM	40,0b ±4,0
Si(0)mM	4,0a ±0,3	Si(1,0)mM	7,0b ±0,3
Se(0)mM	0,6a ±0,02	Se(1,0)mM	1,3b ±0,12
Cu (0,1)mM	0,6a ±0,02	Cu (0,1)mM	1,2b ±0,14

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=5). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

Tabla 3

Absorción atómica de elementos en concentraciones óptimas en células de *Phaeodactylum tricornutum* (cultivo semicontinuo) cultivadas con Algal Incremento Concentración EPA (AEPA) (modificado de Fábregas et al., 1984) y Algal Industrial® (AIPt4) (Fábregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4, 8, 16 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹

Constituyentes <i>AIPt4</i>	Absorción Atómica (fg.célula ⁻¹)	Constituyentes <i>AEPA4</i>	Absorción Atómica (fg.célula ⁻¹)	Constituyentes <i>AEPA8</i>	Absorción Atómica (fg.célula ⁻¹)	Constituyentes <i>AEPA16</i>	Absorción Atómica (fg.célula ⁻¹)
S(0)mM	450,0a ±19,5	S(1,0)mM	770,0b ±10,0	S(1,0)mM	820,12d ±13,10	S(1,0)mM	810,25c ±15,31
Ca(0)mM	90,0a ±7,0	Ca(1,0)mM	150,0b ±10,0	Ca(1,0)mM	640,00d ±59,0	Ca(1,0)mM	420,00c ±17,0
Mg(0)mM	300,0a ±25,0	Mg(1,0)mM	350,0b ±20,0	Mg(1,0)mM	450,0d ±11,0	Mg(1,0)mM	360,00c ±21,0
Zn(1,0)mM	60,0a ±5,0	Zn(0,1)mM	90,0b ±3,0	Zn(0,1)mM	174,15d ±9,05	Zn(0,1)mM	73,80c ±3,60
Fe(20,0)mM	33,0a ±1,06	Fe(20,0)mM	39,0b ±2,25	Fe(20,0)mM	47,15c ±2,8	Fe(20,0)mM	54,15d ±6,0
Si(0)mM	4,0a ±0,3	Si(1,0)mM	4,5b ±0,25	Si(1,0)mM	5,2c ±0,30	Si(1,0)mM	5,9d ±0,20
Se(0)mM	0,6a ±0,02	Se(0,1)mM	1,3c ±0,10	Se(0,1)mM	1,1b ±0,15	Se(0,1)mM	1,7d ±0,12
Cu (0,1)mM	0,6a ±0,02	Cu (1,0)mM	0,74b ±0,06	Cu (1,0)mM	0,82c ±0,05	Cu (1,0)mM	1,1d ±0,14

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=5). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

Tabla 4. Composición de Ácidos Grasos (% del total A.G.), ácidos grasos x célula (A.G. pg.cél⁻¹) y lípidos totales x célula (pg.cél⁻¹) en *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con *Algal Industrial*[®] (AIPt4mM), *Algal Alta Rendimiento* (AARPt4mM), *Algal Incremento Concentración EPA* (AEPA4,8,16mM)..

(AIPt4)			(AARPt4)			(AEPA4)			(AEPA8)			(AEPA16)			
Acido Graso	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	%A.G.	pg.cél ⁻¹	%A.G.	pg.cél ⁻¹
14:0	10.49±1.36	0.457±0.013	11.57±0.58	0.750±0.017	11.77±1.31	0.703±0.012	16.26±1.26	0.540±0.065	14.43±0.95	16.26±1.26	0.540±0.065	14.43±0.95	16.26±1.26	0.540±0.065	14.43±0.95
15:0	0.58±0.06	0.025±0.002	0.49±0.01	0.031±0.003	0.38±0.03	0.023±0.003	0.33±0.03	0.011±0.000	0.38±0.02	0.33±0.03	0.011±0.000	0.38±0.02	0.33±0.03	0.011±0.000	0.38±0.02
16:0	25.96±1.10	1.042±0.077	22.26±1.58	1.221±0.86	27.39±1.91	1.599±0.127	23.01±2.22	0.884±0.012	22.65±2.47	23.01±2.22	0.884±0.012	22.65±2.47	23.01±2.22	0.884±0.012	22.65±2.47
16:1(n-7)	34.65±2.79	1.626±0.163	47.19±4.38	3.552±0.23	46.05±4.71	3.124±0.330	38.89±2.72	1.287±0.175	30.63±2.20	38.89±2.72	1.287±0.175	30.63±2.20	38.89±2.72	1.287±0.175	30.63±2.20
16:2(n-6)	0.50±0.04	0.019±0.001	0.17±0.01	0.011±0.001	0.18±0.02	0.009±0.000	0.50±0.01	0.017±0.002	1.14±0.17	0.50±0.01	0.017±0.002	1.14±0.17	0.50±0.01	0.017±0.002	1.14±0.17
16:2(n-4)	1.34±0.15	0.054±0.002	0.79±0.02	0.050±0.004	1.00±0.07	0.053±0.001	2.19±0.25	0.073±0.007	3.94±0.40	2.19±0.25	0.073±0.007	3.94±0.40	2.19±0.25	0.073±0.007	3.94±0.40
16:3(n-3)	2.03±0.19	0.082±0.002	1.19±0.12	0.076±0.001	1.44±0.17	0.079±0.001	3.41±0.11	0.112±0.016	6.15±0.85	3.41±0.11	0.112±0.016	6.15±0.85	3.41±0.11	0.112±0.016	6.15±0.85
18:0	0.92±0.06	0.036±0.002	0.78±0.07	0.043±0.003	0.47±0.02	0.027±0.002	0.26±0.03	0.009±0.000	0.44±0.02	0.26±0.03	0.009±0.000	0.44±0.02	0.26±0.03	0.009±0.000	0.44±0.02
18:1(n-9)	3.26±0.29	0.130±0.012	1.85±0.13	0.118±0.012	1.30±0.16	0.074±0.009	1.15±0.13	0.038±0.001	1.36±0.18	1.15±0.13	0.038±0.001	1.36±0.18	1.15±0.13	0.038±0.001	1.36±0.18
18:1(n-7)	1.08±0.07	0.042±0.002	0.53±0.06	0.034±0.003	0.42±0.02	0.023±0.003	0.51±0.01	0.017±0.001	0.96±0.08	0.51±0.01	0.017±0.001	0.96±0.08	0.51±0.01	0.017±0.001	0.96±0.08
18:2(n-6)	1.25±0.18	0.049±0.003	0.45±0.04	0.029±0.003	0.52±0.04	0.027±0.001	0.53±0.02	0.018±0.002	0.93±0.02	0.53±0.02	0.018±0.002	0.93±0.02	0.53±0.02	0.018±0.002	0.93±0.02
18:3(n-6)	0.71±0.05	0.028±0.002	0.31±0.03	0.020±0.003	0.26±0.01	0.014±0.002	0.14±0.01	0.005±0.000	0.17±0.01	0.14±0.01	0.005±0.000	0.17±0.01	0.14±0.01	0.005±0.000	0.17±0.01
18:4(n-3)	0.90±0.06	0.036±0.002	0.27±0.03	0.017±0.002	0.43±0.03	0.023±0.002	0.13±0.01	0.004±0.000	0.08±0.00	0.13±0.01	0.004±0.000	0.08±0.00	0.13±0.01	0.004±0.000	0.08±0.00
20:0	0.13±0.01	0.005±0.000	0.05±0.01	0.003±0.000	0.04±0.00	0.002±0.000	0.03±0.00	0.001±0.000	0.05±0.00	0.03±0.00	0.001±0.000	0.05±0.00	0.03±0.00	0.001±0.000	0.05±0.00
20:2(n-9)	0.12±0.01	0.005±0.000	0.04±0.00	0.003±0.000	0.04±0.00	0.002±0.000	0.07±0.00	0.002±0.000	0.08±0.00	0.07±0.00	0.002±0.000	0.08±0.00	0.07±0.00	0.002±0.000	0.08±0.00
20:3(n-5)	0.39±0.02	0.015±0.001	0.14±0.01	0.009±0.000	0.13±0.01	0.007±0.000	0.16±0.02	0.005±0.000	0.47±0.02	0.16±0.02	0.005±0.000	0.47±0.02	0.16±0.02	0.005±0.000	0.47±0.02
20:4(n-6)	0.60±0.03	0.024±0.001	0.36±0.03	0.023±0.002	0.21±0.01	0.011±0.001	0.31±0.03	0.010±0.000	0.91±0.03	0.31±0.03	0.010±0.000	0.91±0.03	0.31±0.03	0.010±0.000	0.91±0.03
20:4(n-3)	0.16±0.01	0.006±0.000	0.07±0.00	0.004±0.000	0.07±0.00	0.004±0.000	0.10±0.01	0.003±0.000	0.21±0.02	0.10±0.01	0.003±0.000	0.21±0.02	0.10±0.01	0.003±0.000	0.21±0.02
20:5(n-3)	6.88±0.56	0.446±0.014	9.99±0.43	0.523±0.011	8.19±0.56	0.493±0.051	11.74±1.16	0.562±0.015	12.56±1.19	11.74±1.16	0.562±0.015	12.56±1.19	11.74±1.16	0.562±0.015	12.56±1.19
22:0	1.86±0.15	0.077±0.001	1.36±0.04	0.089±0.003	0.90±0.04	0.052±0.002	2.23±0.24	0.075±0.005	1.93±0.16	2.23±0.24	0.075±0.005	1.93±0.16	2.23±0.24	0.075±0.005	1.93±0.16
22:3	0.00±0.00	0.000±0.000	0.00±0.00	0.000±0.000	0.00±0.00	0.000±0.000	0.00±0.00	0.000±0.000	0.00±0.00	0.00±0.00	0.000±0.000	0.00±0.00	0.00±0.00	0.000±0.000	0.00±0.00
22:6(n-3)	0.21±0.02	0.0085±0.00	0.15±0.02	0.010±0.003	0.14±0.02	0.0084±0.00	0.18±0.02	0.0086±0.00	0.14±0.02	0.18±0.02	0.0086±0.00	0.14±0.02	0.18±0.02	0.0086±0.00	0.14±0.02
Saturados	39.95±1.5b	1.642±0.173	36.50±2.9a	2.138±0.272	40.94±2.9c	2.406±0.12	42.13±2.7d	1.520±1.16	39.87±3.2b	42.13±2.7d	1.520±1.16	39.87±3.2b	42.13±2.7d	1.520±1.16	39.87±3.2b
Monoinsaturados	38.99±2.5b	1.799±0.155	49.57±4.0e	3.704±0.258	47.77±4.0d	3.221±0.27	40.54±2.9c	1.342±0.17	32.94±1.5a	40.54±2.9c	1.342±0.17	32.94±1.5a	40.54±2.9c	1.342±0.17	32.94±1.5a
Polinsaturados	15.09±1.3c	0.851±0.028	13.93±1.1b	0.698±0.015	11.29±1.0a	0.633±0.080	17.34±1.6d	0.819±0.074	27.18±2.6e	17.34±1.6d	0.819±0.074	27.18±2.6e	17.34±1.6d	0.819±0.074	27.18±2.6e
ω-3	13.05±1.27	0.579±0.019	11.66±0.69	0.631±0.012	10.75±1.41	0.508±0.060	15.88±1.86	0.687±0.010	19.53±1.80	15.88±1.86	0.687±0.010	19.53±1.80	15.88±1.86	0.687±0.010	19.53±1.80
ω-6	3.05±0.21	0.120±0.016	1.29±0.19	0.083±0.002	1.16±0.12	0.062±0.002	1.43±0.16	0.060±0.006	3.15±0.21	1.43±0.16	0.060±0.006	3.15±0.21	1.43±0.16	0.060±0.006	3.15±0.21
ω-3: ω-6	4.28±0.4a	4.28±0.40	9.04±0.4c	9.04±0.44	9.27±0.3c	9.27±0.30	11.10±1.1d	11.10±1.14	6.18±0.7b	11.10±1.1d	11.10±1.14	6.18±0.7b	11.10±1.1d	11.10±1.14	6.18±0.7b
EPA	6.88±0.6a	0.523±0.014	9.99±0.4c	0.446±0.011	8.19±0.6b	0.493±0.051	11.74±1.2d	0.562±0.015	12.56±1.2e	11.74±1.2d	0.562±0.015	12.56±1.2e	11.74±1.2d	0.562±0.015	12.56±1.2e
EPA:ARA	11.46±1.1a	±	27.75±1.2c	±	39.00±2.5e	±	37.87±3.1d	±	13.80±1.1b	37.87±3.1d	±	13.80±1.1b	±	13.80±1.1b	±
Total A.G.	±	4.291±0.77c	±	6.540±0.67d	±	6.260±0.2d	±	3.680±0.4b	±	3.680±0.4b	±	3.680±0.4b	±	2.939±0.11a	±
Total Lípidos	±	5.76±0.55	±	11.56±1.17	±	9.31±0.21	±	9.93±0.35	±	9.93±0.35	±	9.93±0.35	±	10.62±0.95	±

A.G.: ácido graso, DHA, docosahexaénico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=5). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (*p*<0,05)

A.G. ácido graso, DHA, docosaexaenóico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=5). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0,05)

Capítulo 8

Estudio poblacional, modificación bioquímica e incorporación de elementos por ***Artemia franciscana*** y ***Brachionus plicatilis***, ocasionada por el enriquecimiento con ***Phaeodactylum tricornutum*** cultivada en sistema semicontinuo, con una tasa de renovación del 30%, con los medios de cultivo **AARPt y AEPA**.

Diseño experimental

Se empleo un cultivo masivo del rotífero marino *Brachionus plicatilis* en Carboy's de 6 L, los cuales se filtraron y lavaron en periodos cortos con agua destilada para eliminar microbiota y posteriormente pasarlos a un nuevo carboy con agua de mar estéril. Tal proceso preventivo se realizó 24 h antes de iniciar los experimentos con la finalidad de estabulación alimentaria y sanidad de los rotíferos. Para realizar las experiencias de crecimiento poblacional, modificación bioquímica e incorporación de elementos. Los rotíferos a razón de 50 rotíferos.mL⁻¹ se transfirieron a botellas de borosilicato de 1 L con 700 mL de agua de mar autoclavada, sometidos a un flujo de aire de 20 burbujas.minuto⁻¹ aproximadamente, ciclos de luz:oscuridad 12h:12h, una intensidad luminosa de 52,3 $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y mantenidos en una cámara isotérmica con 22±2°C. A primera hora del ciclo de luz se alimentó al rotífero *Brachionus plicatilis*, a razón de 30,000 células.rotífero⁻¹ con biomasa de *Phaeodactylum tricornutum* (en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%) previamente cultivada con las formulaciones **AIPt4=Algal**, **AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16**.

Diariamente a primera hora del ciclo de luz, se realizo el recuento de la densidad de rotíferos.mL⁻¹ así como del número de huevos por hembra, para posteriormente calcular la cantidad de biomasa celular para alimentar a razón de 30,000 células de *Phaeodactylum tricornutum*.rotífero⁻¹.

Los cultivos experimentales se mantuvieron durante 9 días tomando en cuenta que el ciclo de vida de *Brachionus plicatilis* dura aproximadamente 4 días (Ito 1955; 1957) por lo que los experimentos se finalizaron una vez transcurridas 2 generaciones. Al finalizar el periodo se contabilizo la densidad poblacional y numero de huevos producidos, se cosecharon por triplicado 70 mL de cultivo para determinación de peso seco, cenizas y materia orgánica, así como 50 mL ($n=3$) de biomasa, en filtros de malla nitex de 40 μm para determinación de proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, e incorporación de metales; estas muestras se ultracongelaron a -80°C para su posterior análisis.

Se incubaron y eclosionaron en agua salobre al 2,5%, filtrada (1 μm), quistes de *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) del Gran Lago Salado Utha (INVE, Aquaculture, Inc.), en un baño termostático a 28±1°C, una intensidad luminosa de 152,3 $\mu\text{mol quanta/m}^2.\text{s}^{-1}$; por 24h y un flujo de aireación continua de 250 mL/min¹. Una vez eclosionados los nauplios se lavaron con agua destilada y formalina al 4% por 10 segundos, como tratamiento bacteriano preventivo; posteriormente se mantuvieron en agua marina estéril al 3,5%. Se espero a que los metanauplios cumplieran 48h después de la eclosión (DDE), tiempo en el cual han desarrollado un sistema digestivo eficaz-completo y pueden empezar a filtrar no selectivamente alimento (Sorgeloos et al.,2001). Para realizar las experiencias de crecimiento, supervivencia, modificación bioquímica e incorporación de elementos, los metanauplios_{48h} se transfirieron a razón de 2 metanauplios.mL⁻¹ en un volumen de 500mL en botellas de 1 L, sometidos a un flujo de aire de 20 burbujas.minuto⁻¹ aproximadamente, ciclos de luz:oscuridad 12h:12h, se utilizo una intensidad luminosa de 52,3 $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

².s⁻¹, las botellas de cultivo se mantuvieron en un baño termostático a 28±1°C dentro de una cámara isotérmica a 22±2°C.

A primera hora del ciclo de luz se alimentó a *Artemia franciscana*, a razón de 300,000 células.artemia⁻¹ (Gelabert, 2003) con biomasa de *Phaeodactylum tricornutum* (en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%) previamente cultivada con las formulaciones **AIpt4=Algal**, **AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16**.

Diariamente se contabilizó la densidad de células.mL⁻¹ del cultivo de *Artemia* para de esa forma corregir la ración diaria de microalgas de modo que entre el día 1 y 11 se utilizó una densidad celular de entre 300,000 y 5,696,202 células.artemia⁻¹

Los cultivos experimentales se mantuvieron por 10-11 días, tiempo en el cual comenzó el cortejo de apareamiento, para cosechar la población al día 10-11. Se contabilizó la densidad poblacional, se cosecharon por triplicado 40 organismos para determinación de peso seco, cenizas y materia orgánica, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, e incorporación de metales; estas muestras se ultracongelaron a -80°C para su posterior análisis.

Resultados y discusión.

Al igual que ocurrió en el capítulo 3 de la presente disertación se observó que en los dos primeros días de alimentación del rotífero *Brachionus plicatilis* con *Phaeodactylum tricornutum*, cultivada con las diferentes formulaciones (**rAIpt4=ALGAL**, **rAARPt4**, **rAEPA4**, **rAEPA8**, **rAEPA16**), no reveló crecimiento poblacional e incluso fue evidente una disminución de la población inicial (*figura 1*), situación que además se corroboró por la presencia de biomasa celular no filtrada por los rotíferos en cultivo. Este comportamiento pudo ser debido como lo menciona Ferreira, 2006 en sus estudios sobre bioencapsulación y crecimiento poblacional de la misma especie de rotífero, por manipulación, causante de estrés. Por lo que este tiempo consideramos es un periodo de adaptación o fase "lag" como ocurre en copépodos los cuales después de un periodo de ayuno ("starvation") y entre su próxima alimentación dejan de producir individuos vivíparos, para producir solo huevos en las siguientes 9,5-65,5 horas (Ianora, 2005), periodo en el que es posible la eclosión de los huevos producidos por las hembras adultas así como muerte por adaptación de las mismas. Posterior a este proceso a partir del 3er día (*figura 1*) la densidad poblacional de rotíferos comenzó a multiplicarse. Al respecto Snell, 1986; Lubzens and Minkoff, 1988; Hagiwara and Hino, 1990, mencionan que motivo de estrés fisicoquímico las hembras producen huevos dormantes por lo general entre 1 y 8 los cuales tardarán en eclosionar según las condiciones del medio de cultivo; siendo significativamente más pequeños que los 18-23 huevos o más (Ruttner-Kolisko, 1974) producidos asexualmente durante sus 7 o 10 días de vida (Hoff and Snell, 1999).

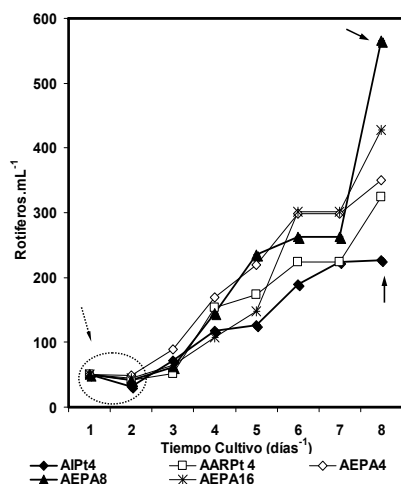


Figura 1. Evolución de la densidad de cultivo de *Brachionus plicatilis* (rotíferos.mL⁻¹) alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada en semicontinuo, tasa de renovación 30% con diferentes medios de cultivo.

El empleo de las formulaciones **AIPt4=ALGAL**, **AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16** en el cultivo de *Phaeodactylum tricornutum* produjo diferencias en la generación de densidad poblacional final de *Brachionus plicatilis*, la cual fluctuó de la siguiente manera: **AIPt4=ALGAL** (227 rotíferos.mL⁻¹), **AARPt4** (324 rotíferos.mL⁻¹), **AEPA4** (350 rotíferos.mL⁻¹), **AEPA8** (565 rotíferos.mL⁻¹) y **AEPA16** (428 rotíferos.mL⁻¹) ver *tabla 1* y *figura 2*. Existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo mencionadas ($p<0,05$). Hoff and Snell, 1999 mencionan que inoculando entre 36 y 66 rotíferos.mL⁻¹ llegan a obtener entre 5 y 8 días de cultivo densidades de 161 a 234 rotíferos.mL⁻¹ alimentando con una mezcla de microalgas y un Booster. Arnold and Holt, 1991 empleando el método de alimentación en base a microalgas, levadura y aceite emulsificado, logra cultivos masivos de rotíferos de solo 150-200 rotíferos.mL⁻¹. Hur 1991, alimentando rotíferos con *Phaeodactylum tricornutum* (cultivada con el medio f/2 de Guillard) por 11 días solo obtiene un rendimiento de 160 rotíferos.mL⁻¹. Schlosser and Anger, 1982; Lubzens, 1987; Miracle and Serra, 1989; Korstad *et al.*, 1989; Hirayama, 1990; Hiawa and Heerkloss, 1994; Patiño, 1995, mencionan que en *Brachionus plicatilis* existen diferentes factores como la temperatura, salinidad, aireación, tipo-tamaño-concentración y calidad del alimento, los cuales afectan la ingestión y multiplicación poblacional; en el presente estudio todos los anteriores parámetros fueron mantenidos constantes excepto la calidad del alimento microalgal vía su cultivo con diferentes formulaciones; por lo que las condiciones de cultivo de la microalga determinaron la supervivencia, tamaño, metamorfosis así como la tasa de reproducción de los organismos filtradores, alimentados con ellas. Es lógico pensar que esta calidad del alimento vía la complejidad mineral de las formulaciones con las que se le cultivo, fue la que produjo la oscilación de la ya citada generación poblacional.

Indicar que en el capítulo 3 de la presente disertación en la incorporación por separado, con diferente concentración de los elementos Ca²⁺, Mg²⁺, Se²⁻, Si⁴⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, y S²⁻ en el medio "ALGAL" para el cultivo de *Phaeodactylum tricornutum* y posterior alimentación del rotífero con esta, solo se obtuvieron densidades poblacionales de entre 137 y 313 rotíferos.mL⁻¹. Whyte and Nagata, 1990; Fulks and Main, 1992; Snell, 1991; Tamaru *et al.*, 1991; Nagata and Whyte, 1992; Vadstein *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 1997 concluyen

que la tasa reproductiva es fuertemente afectada por el tipo y calidad del alimento proveído en su cultivo (Qi *et al.*,2009), así como el tamaño de partícula y las especies de microalgas determinaran la tasa reproductiva de *Brachionus plicatilis* (Sayegh *et al.*,2007; Hu and Xi, 2008; Alva-Martínez *et al.*,2009). Hagiwara *et al.*,1997 mencionan que producciones arriba de 150 rotíferos.mL⁻¹ son indicativo de baja obtención de huevos dormantes los cuales no contribuyen a incrementar la población de inmediato.

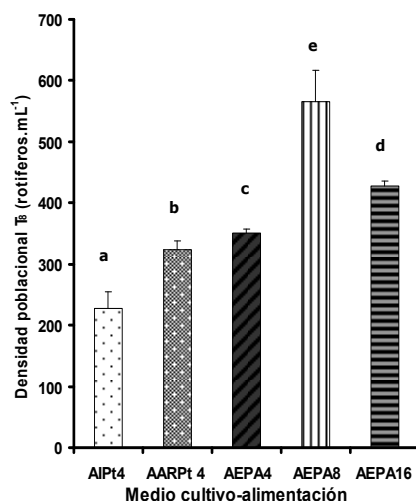


Figura 2. Densidad poblacional (T₉) de *Brachionus plicatilis* (rotífero.mL⁻¹) alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada en semicontinuo, tasa de renovación 30% con diferentes medios de cultivo.

Por otra parte la producción final de huevos.mL⁻¹ fue la siguiente: **AARPt4** (168 huevos.mL⁻¹), **AEPA4** (170 huevos.mL⁻¹), **AEPA8** (259 huevos.mL⁻¹) y **AEPA16** (219 huevos.mL⁻¹) con respecto a el control (**AIPt4=ALGAL**) con 124 huevos.mL⁻¹ (tabla 1), existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo mencionadas ($p<0,05$) tablas 1 y figura 3b; lo que correspondió a 0,73, 0,49, 0,46, 0,51 y 0,38 huevos.hembra⁻¹ respectivamente (figura 3a). Decir que en el capítulo 3 de la presente disertación rotíferos alimentados con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con el medio "ALGAL" reconstituido parcialmente por separado con diferentes concentraciones de Ca²⁺, Mg²⁺, Se²⁻, Si⁴⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, y S²⁻ mostró valores muy similares entre 0,21 y 0,80 huevos.hembra⁻¹ donde solo el cobre y magnesio con 0,80 huevos.hembra⁻¹ mejoran tal productividad. Kostopoulou and Vadstein, 2007 en estudios de crecimiento de variedades de *Brachionus plicatilis*, con diferente concentración de *Nannochloropsis oculata*, en 3,5 días de experimentación obtienen producciones entre 0,84 y 0,96 huevos.hembra⁻¹. Støttrup and McEvoy, 2003 mencionan que la proporción de huevos depende de la calidad de los alimentos.

Cualquier desviación de las condiciones óptimas del alimento se refleja en bajas o altas tasas de producción de huevos en los cultivos de rotíferos. Por ejemplo, una proporción de huevos de menos de 0,13 para cultivos de *Brachionus plicatilis* indica inestabilidad y el colapso futuro posible del cultivo (Snell *et al.*,1987). La producción de huevos por hembra después de dos ciclos generacionales (T₈) se correspondió con la densidad poblacional de las formulaciones **AIPt4=ALGAL** y **AARPt4**, en tanto que con la receta **AEPA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8, y 16mM) tal producción no fue lineal como podría esperarse y se mantuvo conservativa en torno a 0,50 huevos.hembra⁻¹ (tabla 1); tales resultados pueden ser debidos a la viabilidad de eclosión de los huevos dada la calidad

alimenticia de la diatomea vía la formulación de cultivo; al respecto Camus *et al.*, 2009; Gusmão and McKinnon, 2009 mencionan en sus estudios, que la alimentación con diatomeas en copépodos produjo una baja producción de huevos con respecto a otras dietas microalgales. Sin embargo en el presente estudio la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* y su enriquecimiento con diferentes medios de cultivo, mostró influir de manera positiva en la generación de huevos por parte de las hembras amícticas. En la *figura 3a* se puede observar para la mayoría de las formulaciones, tres picos máximos de producción de huevos en los días 3, 5 y 8 de cultivo; resultados similares han sido descritos por Wullur *et al.*, 2009 modificando la salinidad ($r=0,73$ a $0,78$); datos que nos sugieren las siguientes generaciones poblacionales, las cuales incluso coinciden con lo mencionado por Ito 1955; 1957; Wullur *et al.*, 2009 los cuales indican que el ciclo de vida generacional del rotífero es cercano a 4 días.

Nuestros resultados además revelan que las diferentes formulaciones de cultivo para la diatomea modifican su calidad nutricional, lo que conlleva a modificar la tasa generacional en *Brachionus plicatilis*, una herramienta biotecnológica muy importante en la producción de alimento vivo para los siguientes niveles tróficos acuáticos. Motivo del ritmo circadiano 12L:12O al que fueron sometidos los cultivos de rotíferos, se pudo observar una gran uniformidad de tallas, así mismo un gran número de hembras a primera hora del ciclo de luz mostraban entre 3 y 5 huevos, al respecto Ruttner-Kolisko, 1972; Fulks and Main, 1992 mencionan que en condiciones óptimas de alimentación, una hembra puede albergar hasta 5 huevos al mismo tiempo; posterior a ese periodo fue solo ocasional encontrar hembras con huevos y la uniformidad de tallas se perdió. Al respecto Camus and Zeng, 2008 mencionan que con el copépodo *Acartia sinjiensis* la producción de huevos y eclosión de los mismos es debida al efecto del fotoperiodo al que se someten los cultivos masivos; tal y como ocurrió en el presente estudio con *Brachionus plicatilis*. Fábregas *et al.*, 1996b; 1998b indican que la tasa de renovación así como la concentración de nutrientes en efecto combinado en cultivos semicontinuos dan lugar a grandes diferencias en el valor nutritivo de *Phaeodactylum tricornutum*. Ianora 2005, alimentando a hembras de copépodos *Calanus helgolandicus* y *Temora stylifera* con dicha diatomea logra produzcan entre 15 y 23 huevos.día⁻¹ indicando que la diatomea es una buena dieta con respecto a algunos dinoflagelados. El número de huevos predice el estado del cultivo para las próximas 24 h. En general la proporción de huevos depende de la cantidad y calidad del alimento y es afectada por parámetros abióticos como los niveles de oxígeno, temperatura de cultivo, salinidad, pH, y niveles de amonio (Støttrup and McEvoy, 2003). Hoff and Snell mencionan que las microalgas estimulan la maduración y producción de huevos comparado con una alimentación en base a levaduras.

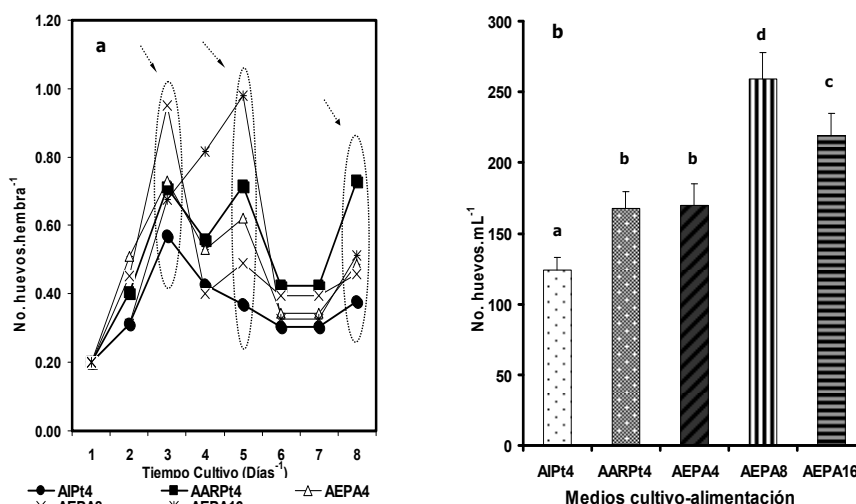


Figura 3. Evolución de la producción de huevos en *Brachionus plicatilis* (huevos.hembra⁻¹) (a) y número de huevos.mL⁻¹ producidos al T₈ (b) alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada en semicontinuo, tasa de renovación 30% con diferentes medios de cultivo. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

Se originaron las siguientes tasas de crecimiento poblacional (**r**) (algunas veces referida como **G**; Støttrup and McEvoy, 2003), para los rotíferos alimentados con *Phaeodactylum tricornutum*, cultivada con las diferentes formulaciones, donde **AARPt4** (0,23 día⁻¹), **AEPA4** (0,24 día⁻¹), **AEPA8** (0,30 día⁻¹) y **AEPA16** (0,27 día⁻¹) mostraron un mejor rendimiento con respecto al medio **AIPt4=ALGAL** con 0,19 día⁻¹. Valores que estuvieron por encima de los obtenidos en rotíferos alimentados con la misma diatomea (capítulo 3), cultivada con el medio de cultivo "ALGAL" reconstituido parcialmente por separado con diferentes elementos y concentración de estos con 0,12-0,23 día⁻¹. Ferreira, 2006 cultivando al rotífero *Brachionus plicatilis* con la microalga *Isochrysis galbana* var. T-iso, con diferentes tasa de renovación, solo obtiene tasas de crecimiento poblacional de entre 0,09 y 0,17. Algunos autores con otras especies de rotíferos han obtenido tasas de crecimiento más altas (0,42-0,81 día⁻¹) en cultivos con otras especies de microalgas (Scott and Baynes, 1978; Yúfera and Pascual, 1983; Carić *et al.*, 1993, Hagiwara *et al.*, 2007; Wullur *et al.*, 2009). Valores de **r** para varias cepas de *Brachionus plicatilis* usualmente se encuentran en el rango de 0,23-1,15, en tanto que para *Brachionus rotundiformis* es posible obtener valores entre 0,54 a 1,37, resultados que dependen del tipo de alimento como levadura húmeda o seca, microalgas secas, congeladas o vivas (Lubzens *et al.*, 2001), así como la especie de microalga con la que se les cultive, temperatura, además de la salinidad (Hirayama *et al.*, 1979; Lubzens *et al.*, 1989; 1995; Hagiwara *et al.*, 1995; Hansen *et al.*, 1997). Hirayama and Satuito 1991 adicionando vitamina B₁₂ al medio de cultivo del rotífero obtiene un **r**=0,39. Por otra parte dada la oscilación que observan nuestros resultados es evidente que los medios de cultivo ejercieron un diferente efecto sobre la calidad nutricional de *Phaeodactylum tricornutum* y que impacta en dicha tasa de crecimiento. La que a su vez está relacionada con la cantidad de alimento y dependiendo del tipo de dieta la cantidad requerida para alcanzar la multiplicación máxima (Yúfera *et al.*, 1983; Lubzens *et al.*, 1995, Milione and Zeng, 2007). A medida que aumenta la tasa de reproducción de una manera curvilínea con

la concentración de los alimentos, la comparación entre la eficacia de diferentes fuentes de alimento debe hacerse en el K_m o valores de saturación para cada tipo de alimento (Hansen *et al.*, 1997).

En lo que respecta a la tasa de conversión alimenticia (TCA) y porcentaje de eficiencia de crecimiento (%EC), por el rotífero alimentado con la microalga, cultivada con los diferentes medios, se observó muy variable, mostrando los siguientes valores para: **AARPt4** (2,47-40,54%), **AEPA4** (2,35-42,53%), **AEPA8** (2,52-39,70%), **AEPA16** (2,10-47,57%) con respecto a el medio **AIPT4=ALGAL** con 1,57-63,65 respectivamente; indicándonos en ambos casos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$). Los valores de TCA nos muestran cuan eficiente es el rotífero para vía la microalga ganar peso de modo, que tales valores entre mas cercanos a 1 sean o inferiores a 1, mejor será la TCA. El %EC en estos casos solo fue cercano al 50%. El comportamiento de las anteriores variables nos da una idea de cuan importante suele ser la complejidad elemental de un medio de cultivo, la cual se ve reflejada en la calidad del alimento vía la cadena trófica.

Los diversos medios de cultivo en *Phaeodactylum tricornutum* produjeron diferentes efectos como alimento en la composición bioquímica de *Brachionus plicatilis* de la siguiente manera: la biomasa celular con **AIPT4=ALGAL**, y **AARPt4** manifestó la siguiente disposición bioquímica **Lípidos>Proteínas>Carbohidratos**(pg.cel⁻¹), en tanto que en los rotíferos una vez consumida la microalga la disposición fue **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos**(ng.rotífero⁻¹) en los dos casos (figura 4 a-b); en el caso de la biomasa con **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16** reveló la siguiente composición proximal **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos**(pg.cel⁻¹), y una vez consumida la microalga por el rotífero **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos** (ng.rotífero⁻¹) en la totalidad de los casos (figura 5 a-b).

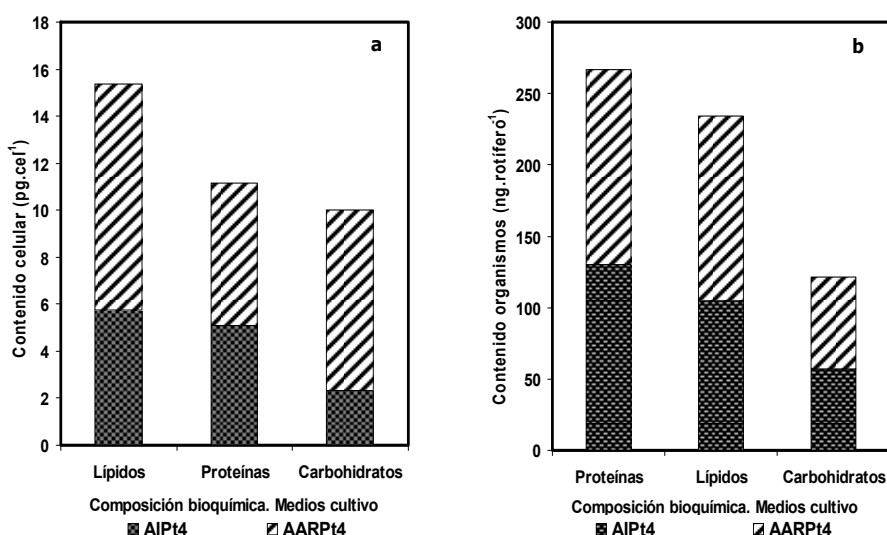


Figura 4.- Evolución de la composición bioquímica de *Phaeodactylum tricornutum* (a) (pg.cel⁻¹) y de *Brachionus plicatilis* (b) (ng.rotífero⁻¹) con respecto a los medios **AIPT4** y **AARPt4**.

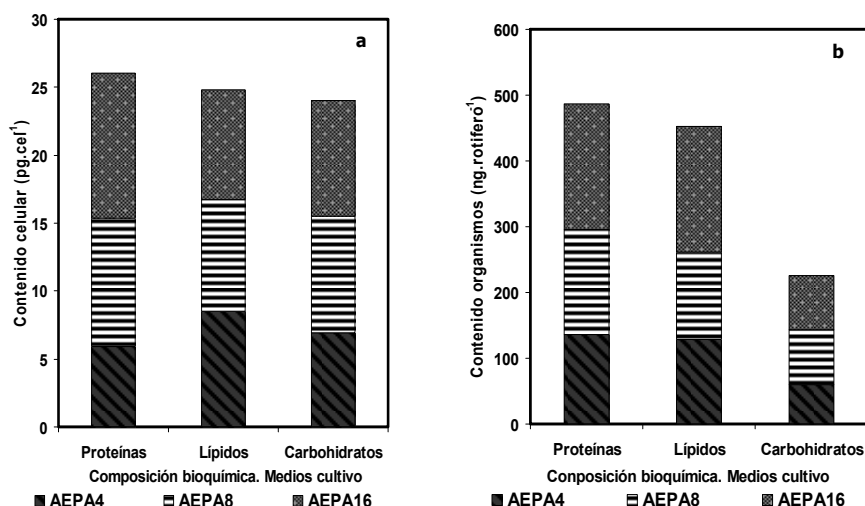


Figura 5.- Evolución de la composición bioquímica de *Phaeodactylum tricornutum* (a) (pg.cel⁻¹) y de *Brachionus plicatilis* (b) (ng.rotífero⁻¹) con respecto a los medios **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16**.

En orden de importancia energética el contenido de proteína en el rotífero fue el mayor combustible bioquímico (figura 4b y 5b), una vez cultivado con la microalga con las diferentes formulaciones, de la siguiente forma: 130,15 ng.rotífero⁻¹(**AIPT4=ALGAL**), 136,33 ng.rotífero⁻¹ (**AARPt4**), 135,57 ng.rotífero⁻¹ (**AEPA4**), 160,07 ng.rotífero⁻¹ (**AEPA8**) y 190,42 ng.rotífero⁻¹ (**AEPA16**) existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre las condiciones **AARPt4** y **AEPA4**; ver tabla 1. Mencionar que dichos valores de proteína con excepción de la condición **AEPA16** fueron inferiores a los obtenidos en el capítulo 3 con rotíferos alimentados con la misma diatomea pero cultivada con el medio ALGAL reconstituido parcialmente con diferentes elementos en torno a 154 y 308 ng.rotífero⁻¹.

En tanto que el segundo combustible lo representó el contenido de lípidos (figura 4b y 5b) con valores de: 104,48 ng.rotífero⁻¹ (**AIPT4=ALGAL**), 130,01 ng.rotífero⁻¹ (**AARPt4**), 127,95 ng.rotífero⁻¹ (**AEPA4**), 133,21 ng.rotífero⁻¹ (**AEPA8**) y 191,77 ng.rotífero⁻¹ (**AEPA16**) (tabla 1), indicando diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$). Observar que dichos valores de lípidos fueron superiores a los obtenidos en el capítulo 3 con rotíferos alimentados con la misma diatomea pero cultivada con el medio ALGAL reconstituido parcialmente con diferentes elementos en torno a 73 y 111 ng.rotífero⁻¹, excepto con los elementos magnesio, calcio, silicio, selenio los cuales mostraron un contenido lipídico entre 134 y 252 ng.rotífero⁻¹.

Por lo que respecta a los carbohidratos (figura 4b y 5b) valores de 57,31, 64,48, 59,78, 84,20 y 82,00 ng.rotífero⁻¹ estuvieron presentes en **AIPT4=ALGAL**, **AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16** comparativamente (tabla 1); indicando la existencia de diferencias significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$). Dichos resultados son superiores comparándolos con los obtenidos en el capítulo 3 de la presente disertación en rotíferos alimentados con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con

el medio de referencia "ALGAL" reconstituido parcialmente con los elementos hierro, cobre, zinc con valores entre 51 y 65 ng.rotífero⁻¹; pero inferiores a los contenidos lipídicos obtenidos con la reconstitución parcial con magnesio, calcio, silicio, selenio y azufre en torno a los 76 y 126 ng.rotífero⁻¹.

Cuando el contenido de proteína se considera como porcentaje de la fracción orgánica, el valor de proteína según la formulación de cultivo probado, fluctuó mínimamente entre 41,02 y 44,58% (*figura 6 y tabla 1*) en comparación con la oscilación obtenida entre 40,18 y 55,89% cuando rotíferos fueron alimentados con la misma diatomea cultivada con el medio de referencia "ALGAL" reconstituido parcialmente con diferentes elementos (capítulo 3). Juego de resultados que se consideran óptimos ya que Lubzens *et al.*, 1989; Frolov *et al.*, 1991; Tamaru *et al.*, 1991; Frolov and Pankov, 1992; Nagata and Whyte, 1992; Fernández-Reiriz *et al.*, 1993; Reitan *et al.*, 1993; Rainuzzo *et al.*, 1997; Øie and Olsen, 1997; Makridis and Olsen, 1999, Lubzens *et al.*, 2001; Lubzens and Zmora, 2003 exponen un rango de contenido de proteína en el rotífero de entre el 28 y 63%. El contenido de proteína por rotífero puede incrementarse de un 60-80% cuando se aumenta la ración alimenticia.

Por lo que respecta a la fracción orgánica de los lípidos mostraron un rango de variación entre 35,29 y 41,31% (*figura 6 y tabla 1*), valores menos oscilantes comparados con los obtenidos en el capítulo 3 con valores entre 26,21 y 39,85%. Teshima *et al.*, 1987; Frolov *et al.*, 1991; Nagata and White, 1992; Fernández-Reiriz *et al.*, 1993; Rainuzzo *et al.*, 1997; Lubzens *et al.*, 2001; Lubzens and Zmora, 2003 mencionan que cerca del 34-43% de los lípidos en rotíferos son fosfolípidos y un 20-55% son triacilglicerol, con pequeñas concentraciones de monoacilglicerol, diacilglicerol, esterol, ester de esterol, y ácidos grasos libres. Los fosfolípidos y triacilglicerol muestran similares perfiles de ácidos grasos, pero estos son grandemente afectados por los lípidos proveídos en la alimentación del rotífero. El contenido lipídico de los rotíferos es generalmente un poco más bajo que el del alimento, lo que indicaría que los lípidos son utilizados por los rotíferos. Los rotíferos utilizan proporciones altas de DHA para la reproducción (Øie and Olsen, 1997) además de que la utilización de los lípidos depende de la temperatura (Olsen *et al.*, 1993).

Finalmente los carbohidratos revelaron un comportamiento entre 17,66 y 22,31%, valores muy similares a los obtenidos en el capítulo 3 de la presente disertación con 16,63 y 21,58%; al respecto Whyte and Nagata, 1990; Frolov *et al.*, 1991; Frolov and Pankov, 1992; Nagata and Whyte, 1992; Fernández-Reiriz *et al.*, 1993; Lubzens and Zmora, 2003 demostraron un rango entre 10,5 y 27%. De donde el 61-80% es glucosa (como glicógeno), un 9-18% de ribosa y 0,8-7,0% de galactosa, manosa, deoxiglucosa, fucosa, y xilosa (Nagata and Whyte, 1992). La fracción orgánica hace más evidente la compartimentalización de los combustibles bioquímicos en *Brachionus plicatilis* además de ser evidente que la calidad del alimento vía la diversidad de medios de cultivo, promovió la calidad proximal del rotífero. Es sabido además que la ración alimenticia afecta la tasa reproductiva del rotífero y su contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos. Støttrup and Attramadal, 1992; Mourente

et al.,1995 demuestran que la calidad nutricional del rotífero depende directamente del alimento con que haya sido cultivado.

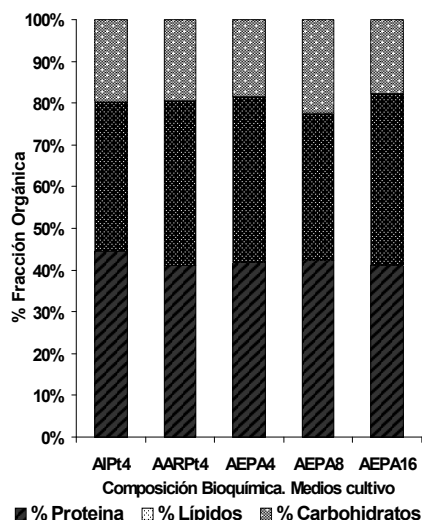


Figura 6.- Fracción orgánica de proteínas, lípidos y carbohidratos en *Brachionus plicatilis* alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes formulaciones

En lo que concierne al valor calórico (VC) por el rotífero con base en la calidad nutricional de *Phaeodactylum tricornutum* vía los diferentes medios de cultivo se observaron los siguientes valores: $82,36 \times 10^7 \text{J.rotífero}^{-1}$ (**AIPt4**), $95,20 \times 10^7 \text{J.rotífero}^{-1}$ (**AARPt4**), $93,41 \times 10^7 \text{J.rotífero}^{-1}$ (**AEPA4**), $105,48 \times 10^7 \text{J.rotífero}^{-1}$ (**AEPA8**), $135,65 \times 10^7 \text{J.rotífero}^{-1}$ (**AEPA16**) indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) (tabla 1). Tales contenidos de VC fueron superiores comparándolos con los obtenidos en el capítulo 3 con elementos como el hierro, cobre, azufre, zinc y selenio en la reconstitución parcial del medio "ALGAL" en el rango de 74 a $118 \times 10^7 \text{J.rotífero}^{-1}$, sin embargo rotíferos con magnesio, calcio, silicio mostraron mayores rendimientos en torno a 161 y $183 \times 10^7 \text{J.rotífero}^{-1}$.

Fernández-Reiríz et al.,1993; Lubzens and Zmora, 2003, mencionan que el valor calórico encontrado en los rotíferos dependerá de la dieta en un rango de $134 \times 10^7 \text{J.rotífero}^{-1}$ con levadura de cerveza y $200 \times 10^7 \text{J.rotífero}^{-1}$ después de 6 h de enriquecimiento con boostings. Demostrando nuestros resultados que la calidad del alimento del rotífero vía el enriquecimiento mineral mediante la microalga muestra diversos grados de calidad en el VC del rotífero en cultivo.

En lo que atañe al peso seco (PS) por rotífero, en base a la microalga cultivada con las diferentes formulaciones, expresó los siguientes valores: $299,01 \text{ ng.rotífero}^{-1}$ (**AIPt4=ALGAL**), $340,02 \text{ ng.rotífero}^{-1}$ (**AARPt4**), $332,48 \text{ ng.rotífero}^{-1}$ (**AEPA4**), $390,58 \text{ ng.rotífero}^{-1}$ (**AEPA8**) y $482,34 \text{ ng.rotífero}^{-1}$ (**AEPA16**) (figura 7a y tabla 1); indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$). Observar que con respecto a la condición **AEPA** con diferente concentración de nutrientes la evolución del PS mostró un coeficiente de correlación r^2 de $0,98$ (con ajuste a una tendencia lineal positiva) (figura 7b). Valores de peso seco que corresponden con la evolución de el peso orgánico (proteínas+lípidos+carbohidratos ng.rotífero^{-1}), $291,94$, $330,82$, $323,30$, $377,48$ y $464,19 \text{ ng.rotífero}^{-1}$ respectivamente; y por

ende con el contenido de materia orgánica por rotífero (tablas 1-2). Decir que en el capítulo 3 de la presente disertación dada la inclusión de diferentes elementos en la reconstitución parcial del medio de cultivo "ALGAL" para el cultivo de *Phaeodactylum tricornutum* fue posible obtener una gran oscilación de valores de peso seco del organismo entre 286 y 654 ng.rotífero⁻¹. Lubzens *et al.*, 1989 mencionan en sus investigaciones con *Brachionus plicatilis* que su valor nutricional dependerá de su peso seco, valor calórico y composición bioquímica y que es reflejo de la cantidad y calidad de su alimento.

El peso seco de un rotífero es muy variable en la literatura es frecuente hallar valores entre 300 y 600 ng, por lo que es evidente que en base a calidad del alimento vía los diferentes medios de cultivo probados en este estudio es que ejerció un efecto en la variación del peso seco por rotífero y no la ración diaria de *Phaeodactylum tricornutum* la cual siempre fue constante (30,000 cel.rotífero⁻¹) y que además satisficó las necesidades del rotífero. Theilacker and Kimball, 1984; Lubzens *et al.*, 1989 indican que el peso seco del rotífero dependerá por sobre todo del tamaño y estado nutricional en el rango de 120-360 ng.rotífero⁻¹ excluyendo los huevos; sin embargo con abundante alimento de calidad en su periodo de vida las hembras pueden llegar a pesar 620 ng.rotífero⁻¹. Yufera *et al.*, 1997 demuestran que el peso seco de *Brachionus plicatilis* se encuentra dependiendo de la calidad del alimento y tasa reproductiva entre 600 y 800 nanogramos por individuo.

En cuanto al contenido de cenizas por rotífero como se puede observar en la figura 7a y tabla 1 vario con respecto al medio de cultivo con el que fue cultivada *Phaeodactylum tricornutum*, donde el medio control mostró 7,47 ng.rotífero⁻¹ (**AIPT4=ALGAL**), en tanto que los medios **AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16** mostraron 9,20, 9,18, 13,10 y 18,15 ng.rotífero⁻¹ respectivamente; indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre las condiciones **AARPt4**, y **AEPA4**. Expresar que con respecto a la condición **AEPA** con diferente concentración de nutrientes la evolución de cenizas reveló un coeficiente de correlación r^2 de 0,99 (con ajuste a una tendencia lineal positiva) (figura 7b).

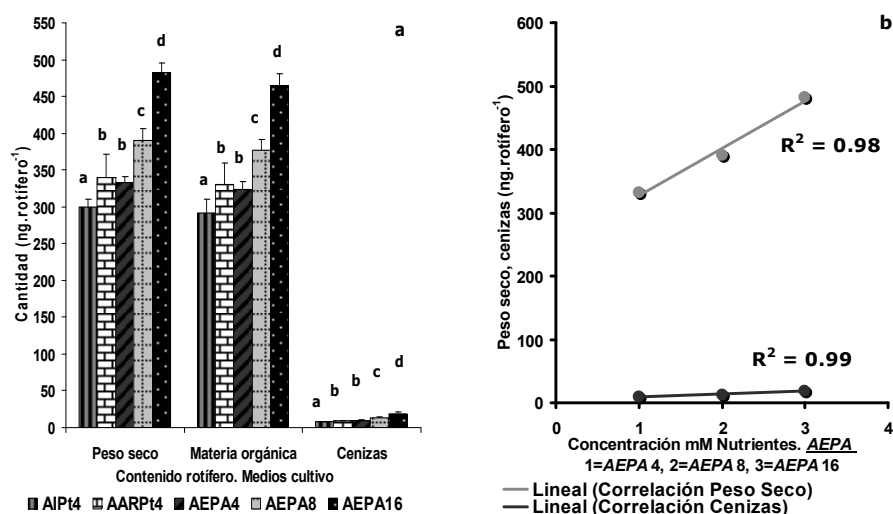


Figura 7.- (a) Contenido rotífero: peso seco, materia orgánica y cenizas (ng.rotífero⁻¹) alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo con diferentes medios de cultivo. **(b)** Correlación concentración nutrientes medio de cultivo **AEPA**. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

La incorporación de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} y Cu^{2+} por *Brachionus plicatilis* vía *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con los diferentes medios de cultivo se puede observar en la figura 8 a-b y figuras 9 a-b y tablas 2-3; donde las cantidades de incorporación en el rotífero fueron muy variables dependiendo del medio de cultivo, lo que nos indicó la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones ($p<0,05$), tablas 2-3. Tales diferencias concuerdan con los valores de cenizas reportados en todas las condiciones de cultivo, que además son evidentes en el comportamiento del peso seco y orgánico del rotífero vía el alimento. Un incremento en la cantidad de los elementos-ingredientes de los medios de cultivo, se vio reflejado en la microalga (capítulo 7) y por ende en el siguiente nivel trófico (rotífero), provocando por tanto un descenso del peso orgánico acompañado de variaciones en el peso seco del rotífero (tabla 1).

El comportamiento de incorporación de los elementos en base a su concentración fue el siguiente: $S^{2-}>Ca^{2+}>Mg^{2+}>Fe^{3+}>Zn^{2+}>Si^{4+}>Se^{2-}>Cu^{2+}$, tal patrón de incorporación del rotífero fue conservativo empleando las diferentes formulaciones de cultivo. Demostrar que en el caso del medio de cultivo **AEPA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8, 16mM) se obtuvieron coeficientes de correlación en la incorporación de S^{2-} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} de $r^2=0,99$, $0,86$, $0,96$ y $0,98$ respectivamente, en todos los casos con ajuste a una tendencia lineal positiva (figura 10a). Por lo que respecta al Zn^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} y Cu^{2+} mostraron una r^2 de $0,93$, $0,98$, $0,99$ y $0,97$ comparativamente con ajuste a una tendencia lineal positiva en todos los casos (figura 10b).

Los invertebrados acuáticos pueden acumular ciertos elementos lo cual dependerá de la biodisponibilidad vía su alimento (Wang and Fisher, 1999a) . Recientemente, estudios han demostrado que más del 50% de ciertos elementos en los organismos marinos se han obtenido exclusivamente a partir de la dieta (Wang and Fisher, 1998). Esto es especialmente cierto (>95%) para el selenio (Wang and Fisher 1998, 1999b). Recientemente más y más atención se ha dedicado al estudio de la acumulación de elementos por las microalgas y su posterior transferencia a copépodos marinos (Wang and Dei, 2001a; Wang et al.,2001). Estos estudios han indicado que el enriquecimiento de nutrientes puede provocar un aumento de la absorción de elementos por las microalgas y su posterior transferencia a copépodos (Wang et al.,2007).

Hamre et al.,2008 demostraron un aumento de la supervivencia de larvas de cod (bacalao) hasta un 32% durante el periodo de alimentación con rotíferos enriquecidos con yodo y selenio, además de que la concentración de micronutrientes en las larvas aumento en respuesta al enriquecimiento con selenio, pero no en respuesta al enriquecimiento con yodo.

Matsumoto et al.,2009 mencionan que un incremento de la concentración de zinc en el rotífero alimentado con *Chlorella*, obedeció al previo enriquecimiento de la microalga con este elemento en cortos periodos de tiempo. Comportamiento similar ocurrió en el presente estudio cuando se empleo la condición de cultivo del rotífero **AEPA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8, 16mM), ajustándose dicha conducta a una tendencia lineal positiva ($r^2=0,93$).

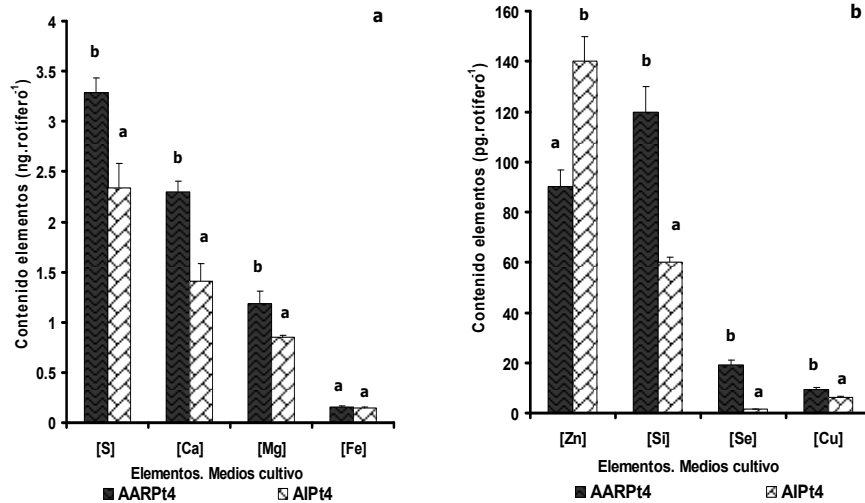


Figura 8.-Incorporación de elementos por *Brachionus plicatilis* alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con **AARPt4** y **AIPt4**: **(a)** S²⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, **(b)** Zn²⁺, Si⁴⁺, Se²⁻, Cu²⁺. Media ± SD (n=5). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa (p<0,05).

El decremento del contenido orgánico del rotífero con respecto al peso seco, alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con las diferentes formulaciones, fue compensado con el contenido elemental en las cenizas (tablas 1).

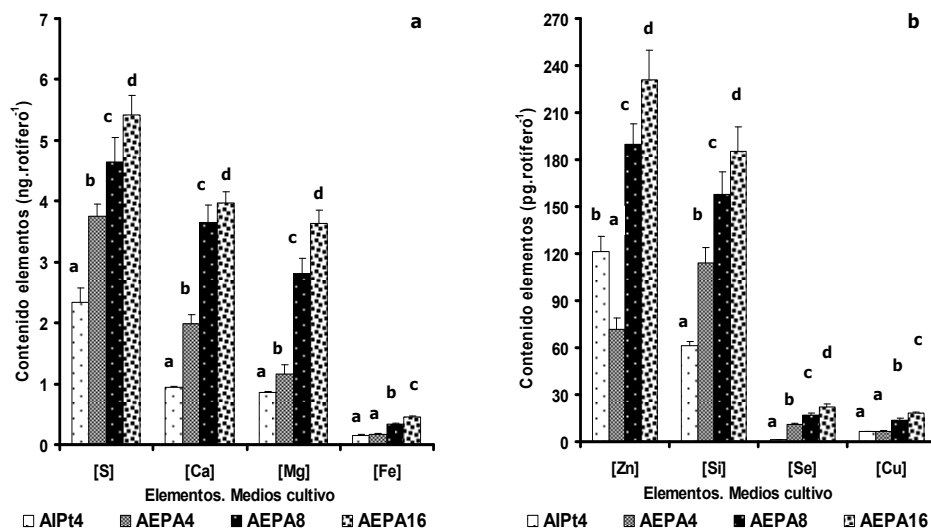


Figura 9.-Incorporación de elementos por *Brachionus plicatilis* alimentado con *Phaeodactylum tricornutum*. en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con **AIPt4**, **AEPA4**, **8 y 16mM**: **(a)** S²⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺, **(b)** Zn²⁺, Si⁴⁺, Se²⁻, Cu²⁺. Media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa (p<0,05).

Existe poca información sobre la composición mineral de los rotíferos, Hoff and Snell, 1999 mencionan al respecto que son varios los metales en el orden de los traza detectados, sin embargo no se ha evaluado el efecto de la dieta sobre estos, pero algunos resultados sugieren que alimentar rotíferos con *Nannochloropsis* sp incrementa ligeramente su contenido de sodio, potasio, zinc, cobre y manganeso (Watanabe *et al.*, 1983). Ferreira, 2006 enriqueciendo rotíferos en periodos de 8 días menciona que dependiendo de la

microalga empleada será el grado de acumulación de diferentes minerales, además de que el contenido de estos tiende a incrementarse en la medida en que se aumenta la tasa de renovación en cultivos en semicontinuo. Normalmente poca atención se ha prestado a la nutrición mineral de organismos acuáticos, algunos autores no lo consideran un factor determinante del valor nutritivo de la dieta (Watanabe *et al.*, 1983).

Sin embargo Robin, 1989 consiguió incrementar el crecimiento de larvas de rodaballo enriqueciendo rotíferos con una mezcla de minerales. La forma y concentración en la que se suministra determinado complejo de elementos dada su importancia en procesos fisiológicos, metamórficos y de supervivencia es de crucial importancia en su bioacumulación a través de la cadena trófica. Ferreira, 2006 menciona en su disertación que es de relevante importancia tener en cuenta la biodisponibilidad de los elementos traza en el momento de formular los medios nutritivos ya que puede ser importante para mejorar la composición bioquímica de los organismos que forman parte de la cadena nutritiva en acuicultura, como resultado evidente en el presente estudio.

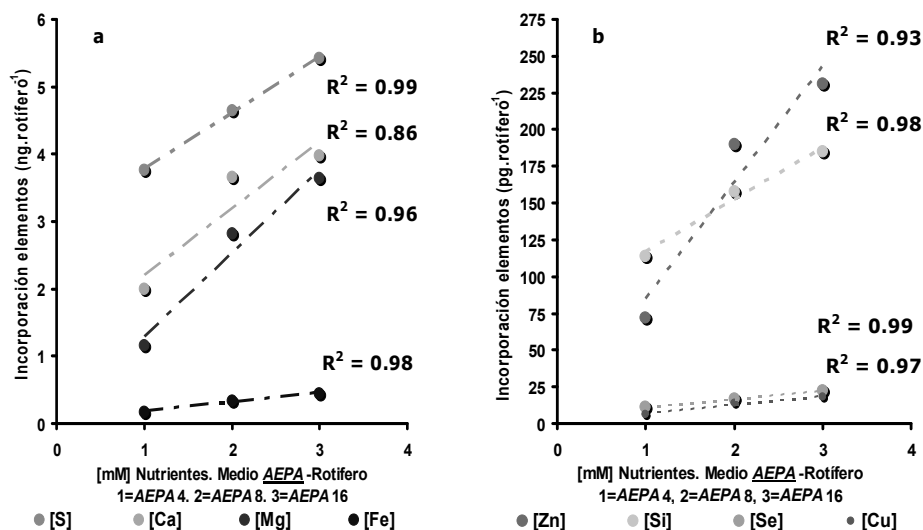


Figura 10.- Coeficientes de correlación en la incorporación de elementos por *Brachionus plicatilis* alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con el medio **AEPA**4, 8 y 16mM: **(a)** S²⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺, **(b)** Zn²⁺, Si⁴⁺, Se²⁻, Cu²⁺. Media ± SD (n=3).

El contenido de ácidos grasos en *Brachionus plicatilis* mostró la misma tendencia que *Phaeodactylum tricornutum* (Frolov *et al.*, 1991; Robin, 1995; Shin *et al.*, 2008), cultivada con **AIPt4=ALGAL**, **AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16**; donde los ácidos grasos (AG) más abundantes entre un 2,26 y 54,36% están representados por el 14:0, 16:0 y el 16:1(n-7), valores que demuestran un mayor rendimiento comparados con los reportados en rotíferos alimentados con la misma diatomea (capítulo 3) cultivada con el medio de cultivo ALGAL reconstituido parcialmente con diferentes metales y metaloides con 6 y 36% estimándose en conjunto en un 58,8-69,26% del total de los AG, contra los 64,23-78,61% del presente estudio. Otros AG monoinsaturados y poliinsaturados de cadena corta entre un 0,29 y 5,94% son el 16:3(n-3), 18:0, 18:1(n-9), 18:1(n-7), 18:2(n-6) y 20:0, resultados muy cercanos en cantidad y calidad a los obtenidos en el capítulo 3 con 2-7%; en tanto ácidos grasos con más

de 20 carbonos que representan un rango de 0,23-8,65% son el 20:4(n-6), 20:4(n-3), 20:5(n-3), 22:5(n-3) y 22:6(n-3), valores que se encuentran dentro los conseguidos en el capítulo 3 con 0,5-10,5%. Destacar que el ácido graso 22:5(n-3) no aparecía como detectable en la biomasa microalgal cultivada con las diferentes formulaciones, sin embargo en el rotífero una vez alimentado pudo registrarse entre 0,63 y 1,57%. En tanto que el ácido graso docosahexaenoico 22:6(n-3) indicó una presencia en el rotífero de 0,55 a 1,27%; donde el medio **AEPA** en concentración de nutrientes 4, 8 y 16mM indicó un índice de correlación $r^2=0,81$ (con ajuste a una tendencia lineal positiva) (figura 11b) respecto a la concentración de DHA. Frolov *et al.*,1991 en su estudio sobre la composición bioquímica de *Brachionus plicatilis* menciona valores muy inferiores al presente estudio con 0,20%.

Las diferentes formulaciones (**AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16**) en el rotífero vía *Phaeodactylum tricornutum*, demostraron evolucionar a decrecer porcentualmente los AG saturados principalmente el 14:0 para beneficiar el incremento de AG monoinsaturados (18:1n-9, 18:1n-7) y poliinsaturados principales (20:4n-3, 20:5n-3, 22:5n-3 y 22:6n-3) en el rotífero (tabla 4). Siendo un hecho que en base a la concentración del ácido palmítico (16:0) y palmitoleico (16:1(n-7) fue posible la elongación y desaturación de la cadena de carbonos de los ácidos grasos vía dos sistemas enzimáticos como la *acetyl-coA* y *ácido graso sintetasa* (Huang *et al.*,2010) bondad característica de los rotíferos los cuales pueden sintetizar otros ácidos grasos *de novo* de cadena más larga, importantes y de concentración apreciable en el rotífero (Lubzens *et al.*,1985; Gurr *et al.*,2002; Shin *et al.*,2008), como lo fueron el 16:3(n-3), 18:0, 18:1(n-9), 18:1(n-7), 18:2(n-6), y 20:0 que originan series de otros AG insaturados de cadena aun más larga como el 20:5(n-3), 22:5(n-3) y 22:6(n-3) (tabla 4). Reitan *et al.*,1993 demostraron una mejoría significativa en el crecimiento, supervivencia y viabilidad de larvas de rodaballo a la metamorfosis, por la adición de determinadas microalgas ricas en ácidos grasos altamente poliinsaturados (PUFAs) a rotíferos. Sugiriendo que las microalgas contribuyen a la mejoría de los lípidos, especialmente el EPA y DHA, y el contenido en proteínas de los rotíferos (Øie *et al.*,1997) ya que los rotíferos por naturaleza son pobres en los requerimientos de PUFAs para estadios larvales tempranos (Bell *et al.*,2003). En el presente estudio destaca por su concentración el ácido graso eicosapentaenoico (Dunstan *et al.*,1994; Ying *et al.*,2000) como precursor de eicosanoides (Dyeberg, 1986) en larvas tempranas de organismos marinos, el cual estuvo presente en el rotífero de la siguiente forma: 4,01% (**AIpt4=ALGAL**), 5,43% (**AARPt4**), 4,90% (**AEPA4**), 7,69% (**AEPA8**) y 8,65 (**AEPA16**), indicándonos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$), ver figura 11a y tablas 4. Los rotíferos alimentados con la condición **AEPA** con diferente concentración de nutrientes revelaron un coeficiente de correlación r^2 de 0,93 (con ajuste a una tendencia lineal positiva) (figura 11b) respecto a la concentración de EPA.

Los valores de EPA según su concentración en el rotífero de el presente estudio, se encuentran por debajo de lo reportado por Hur, 1991; Frolov *et al.*,1991 alimentando rotíferos con *P. tricornutum* los cuales mencionan obtener un 15,5-17,59% de EPA. Sin embargo Ying *et al.*,2000 menciona un rango de entre 6,5 y 19,5 % rango dentro de el cual caen nuestros resultados (tabla 4); mencionando tales autores que la existencia de diversas

cepas o líneas de la especie y diversidad de sitios de donde han sido aisladas, así como la constitución del medio de cultivo trae consigo una gran variabilidad de sus lípidos totales así mismo los AG totales. Ácidos grasos como el 22:5(n-3) y 22:6(n-3) aparecen en la cuantificación de AG importantes debido a los procesos enzimáticos antes descritos; y como reflejo de la calidad de los lípidos de la microalga. Frolov *et al.*,1991 mencionan que la aparición y concentraciones de los anteriores AG en el rotífero son debidas a los periodos de alimentación encontrando estos autores un comportamiento lineal. Los ácidos grasos pueden proveer de información sobre el tipo y calidad de dieta ingerida (Dalsgaard *et al.*,2003). Matsumoto *et al.*,2009 mencionan que la inclusión de determinadas cantidades de zinc así como de otros elementos traza influyen sobre la riqueza de ácidos grasos de la microalga *Chlorella* que influye a su vez sobre la calidad del rotífero el cual además funciona como un vehículo para que el zinc cubra los requerimientos funcionales de larvas de peces marinos así como supervivencia (Hamre *et al.*,2008) con elementos como el yodo y selenio los cuales incrementan la concentración de los ácidos grasos en el rotífero. Johnston *et al.*,2008 indican la importancia de la nutrición mineral de elementos como el calcio, cobalto, cobre, hierro, magnesio, manganeso, zinc, en todo el ciclo biológico de peces marinos, sobre la calidad de huevos vía la vitelogenina lo que produce huevos con mejores perfiles de PUFAs.

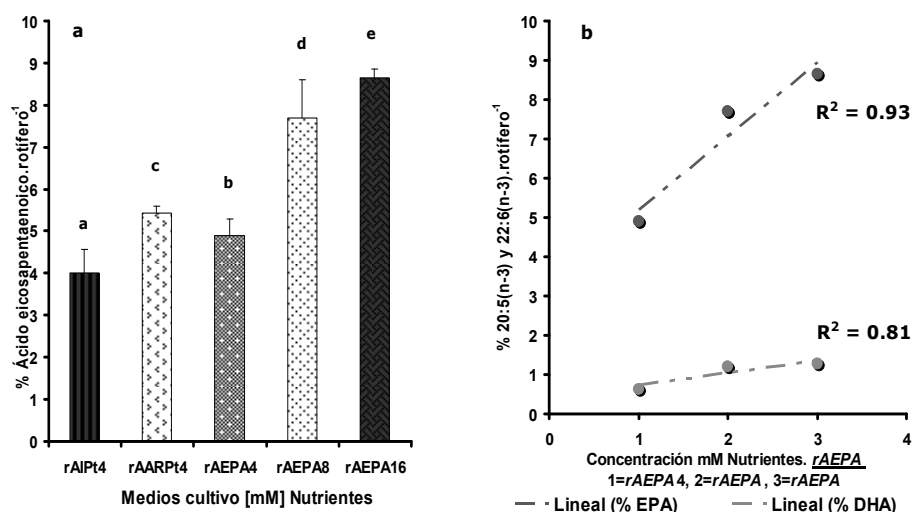


Figura 11. Contenido de **EPA.rotífero⁻¹** con diferentes medios de cultivo **(a)** y coeficientes de correlación **EPA** y **DHA** con **AEPA** 4, 8 y 16mM**(b)** en *Brachionus plicatilis* alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹. Media \pm SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p < 0,05$).

El contenido de AGT (ng.rotífero⁻¹) que correspondió, del contenido lipídico de *Brachionus plicatilis* alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes formulaciones fue el siguiente: **rAIPt4=ALGAL**(69,16%), **rAARPt4**(58,87%), **rAEPA4**(53,11%), **rAEPA8**(44,40%), **rAEPA16**(17,46%) tales contenidos casi se correspondieron en cantidad con los AGT en la diatomea (capítulo 7). Los presentes resultados fueron superiores a los reportados en el capítulo 3 de la presente disertación en rotíferos cultivados con las condiciones Mg²⁺(23,42%), Ca²⁺(32,19%), Si⁴⁺(27,70%), Se²⁻(31,30%), S²⁻(26,96%), Zn²⁺(26,16%). Respecto a tales porcentajes autores como Teshima *et al.*,1987; Frolov *et al.*,1991; Nagata and White, 1992; Fernández-Reiriz *et al.*,1993;

Rainuzzo *et al.*,1997; Lubzens *et al.*,2001, mencionan que cerca del 34-43% de los lípidos en rotíferos son fosfolípidos y un 20-55% son triacilgliceroles, con pequeñas concentraciones de monoacilgliceroles, diacilgliceroles, esteroides, ésteres esteroides, y ácidos grasos libres. Los fosfolípidos y triacilgliceroles muestran similares perfiles de ácidos grasos, pero estos son grandemente afectados por los lípidos proveídos en la alimentación del rotífero (Rainuzzo *et al.*,1997). Es en base a nuestros resultados que observamos cuan importante y variable resultaron las diferentes formulaciones de cultivo en la modificación del perfil bioquímico en la cadena trófica.

Se hallaron importantes diferencias en la evolución porcentual y ng.rotífero^{-1} de los ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGM) y poliinsaturados (AGP), existiendo en todos los casos diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo experimentadas ($p<0,05$) ver *tabla 4* y *figura 12a*. Manifestar que en el caso del cultivo **raEPA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) la evolución de dichos ácidos grasos expresó coeficientes de correlación $r^2=0,98$ (AGP), 1,0(AGS), 0,99(AGM), con ajuste a una tendencia lineal positiva en el 1er caso y 2do caso y negativa en el 3er caso (*figura 12b*).

Se observó un decremento de los AGM de la condición **raARPt4** con respecto a la condición **raIPt4=ALGAL**; lo que correspondió con un incremento de los AGP del primer caso sobre el segundo; mismo comportamiento ocurrió con la condición **raEPA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM), ver *figuras 12a* y *tabla 4*. Por lo tanto el contenido de AGP de las condiciones **raARPt4**, **raEPA4**, **raEPA8** y **raEPA16** expresaron valores superiores en rendimiento con respecto a la condición control **raIPt4=ALGAL** (*figura 12a*). Lin *et al.*,2007 mencionan que en las microalgas los AGS y los AGM así como los AGP subtotales aumentan de manera exponencial a principios de la fase estacionaria para posteriormente disminuir en la fase estacionaria tardía.

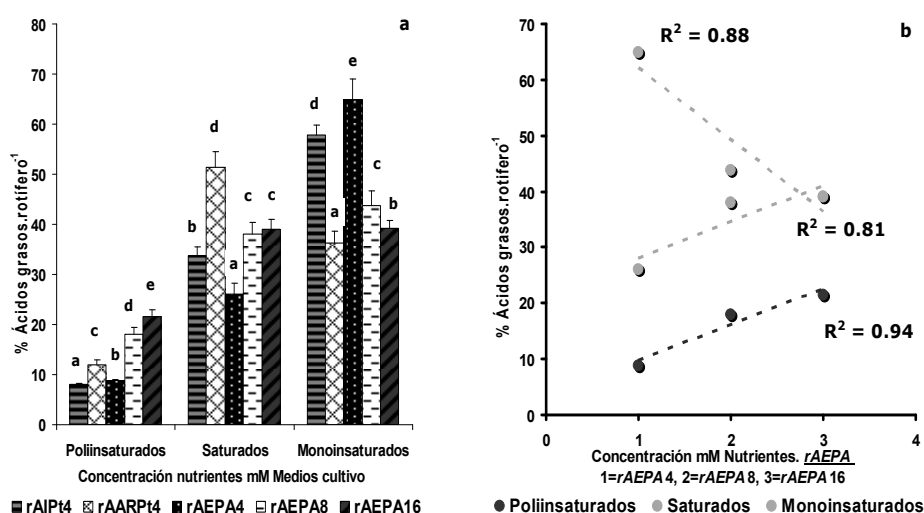


Figura 12. (a) Contenido porcentual de Ácidos grasos en *Brachionus plicatilis* alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%. día^{-1} con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficientes de correlación ácidos grasos, condición de cultivo **raEPA**, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

Los AGP se subdividen en tres familias, mediante las cuales se derivan los procesos de elongación y desaturación mediante las series ω -9, ω -6 y ω -3; de los cuales las series importantes son la ω -3 y ω -6, así mismo la proporción entre estas dos series es de relevante importancia en el valor energético en cada uno de los niveles tróficos, aspecto que se ha descuidado en la nutrición de organismos marinos (Estévez *et al.*, 1999), por lo que una mayor proporción de los ω -3 en la cadena trófica es imprescindible en efectivos mecanismos formadores de membrana durante la metamorfosis de organismos marinos (Reitan *et al.*, 1994; Estévez and Kanazawa, 1995).

Es así que las proporciones de ácidos grasos ω -3: ω -6 por rotífero mostraron diferencias significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación (**rAARPt4**, **rAEPA4**, **rAEPA8** y **rAEPA16**) con respecto al control (**rAIpt4=ALGAL**) ($p<0,05$), excepto entre **rAEPA8** y **rAEPA16**, ver *tablas 4* y *figura 13a*. La proporción porcentual de los AG ω -3: ω -6 en los rotíferos estudiados se encontró entre 1,68:1% y 2,75:1% (*tabla 4*). Indicar que tal proporción ω -3: ω -6 en los rotíferos fue entre 3 y 4 veces menor, comparada con la proporción encontrada en el alimento (capítulo 7) con 4,28, 9,04, 9,27, 11,10 y 6,18:1% respectivamente. Se consiguió un índice de correlación $r^2=0,85$ (*figura 13b*) con ajuste a una tendencia lineal negativa con el medio **rAEPA** respecto a dicha proporción, cuando se incremento la concentración de nutrientes (4, 8, y 16 mM).

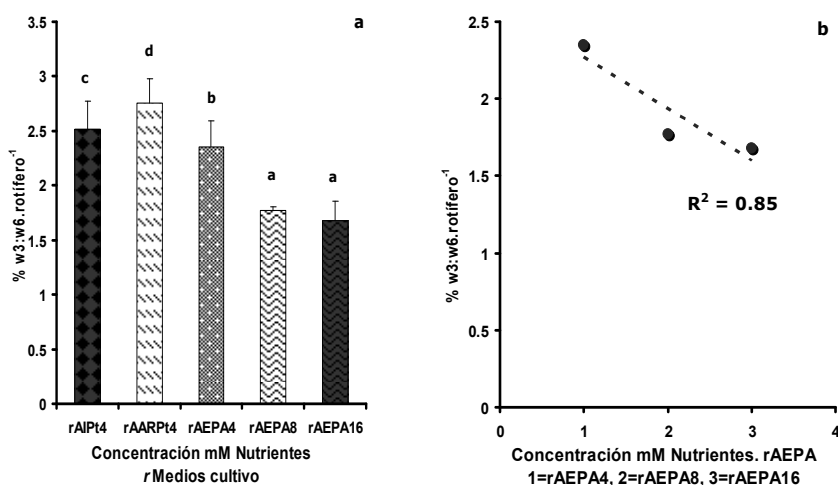


Figura 13. (a) Contenido porcentual de Ácidos grasos ω 3: ω 6 por rotífero alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficiente de correlación ácidos grasos ω 3: ω 6 cultivo **rAEPA4**, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existen diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

Un aspecto importante desde el punto de vista nutricional en niveles superiores de la trama trófica alimenticia; es la proporción que existe del total de los ácidos grasos, el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3 EPA) y el ácido araquidónico (20:4n-6 ARA), tal proporción EPA:ARA es muy importante en la alimentación de las primeras etapas de desarrollo larval de organismos marinos.

En los peces planos, la metamorfosis y el desarrollo de la pigmentación son controlados a nivel nervioso y neuroendocrinológico. En consecuencia, la producción anormal de eicosanoides en el cerebro como resultado de la alteración de los niveles de ARA y EPA trae consigo graves consecuencias para el desarrollo y la metamorfosis de las larvas de peces planos, incluyendo su anormal pigmentación; por lo que la proporción de EPA que promueve la formación de membranas a nivel celular sobre la proporción de ARA deberá ser siempre superior (Bessonart *et al.*,1999; Estévez *et al.*,1999). Se ha sugerido que una proporción óptima de DHA:EPA:ARA es 1,8:1,0:0,12 para larvas de rodaballo (Sargent *et al.*,1999).

Brachionus plicatilis alimentado con la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* la cual fue modificada bioquímicamente mediante las diferentes formulaciones de cultivo, mostró la posibilidad de alterar en el rotífero la proporción **rEPA:ARA** de la siguiente manera: 11,46:1% (**rAIPT4=ALGAL**), 18,72:1% (**rAARPt4**), 21,30:1% (**rAEPA4**), 21,97:1% (**rAEPA8**) y 32,04:1% (**rAEPA16**) ver *tablas 4 y figura 14a*; indicándonos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto a el control ($p<0,05$). Además fue posible observar que la condición **rAEPA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) se ajustó a una tendencia lineal positiva en el incremento de la proporción **rEPA:ARA** con una $r^2=0,80$ (*figura 14b*). Tales resultados superan los descritos en el capítulo 3 de la presente disertación en rotíferos con proporciones de 7,79:1% al 19,98:1%. Observar además que las presentes proporciones **rEPA:ARA** fueron ligeramente inferiores con respecto a las halladas en el alimento del rotífero (capítulo 7) con valores entre 13,80:1% a 39,00:1%. Sin embargo son resultados que superan a los descritos por Frolov *et al.*,1991 encontrando una proporción de 3,09:1%. Sargent *et al.*,1999; Estévez *et al.*,2001; Bell *et al.*,2003 sugieren que una normal supervivencia, crecimiento, pigmentación y metamorfosis se logra cuando el alimento vivo posee una relación EPA:ARA de 4,1-4,2:1 y también con una proporción de EPA:ARA tan alta como 20:1; sin embargo relaciones entre 1,5:1, 0,4:1 y 0,3:1 son insuficientes para el correcto desarrollo larval. Relaciones descritas en el presente capítulo cubren eficientemente tales necesidades mediante los rotíferos modificados bioquímicamente por la alimentación microalgal la cual fue cultivada con diferentes formulaciones, resultando por tanto que una adecuada nutrición mineral vía la cadena trófica resulta una excelente herramienta biotecnológica en la modificación del alimento vivo. Hamre *et al.*,2008 enriqueciendo rotíferos con una mezcla de yodo y selenio logro una proporción EPA:ARA de 7,2:1%, la cual fue superior en comparación con rotíferos sin enriquecer.

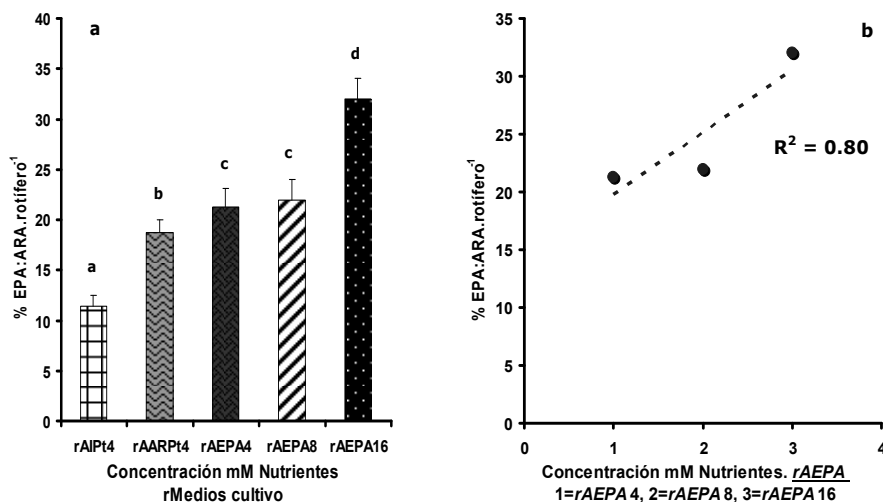


Figura 14. (a) Contenido porcentual de Ácidos grasos **EPA:ARA** por rotífero alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficiente de correlación ácidos grasos **rEPA:ARA** con el medio de cultivo **rAEPA**4, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existen diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

Un gran numero de rotíferos alcanzando fácilmente varios miles de millones, pueden ser necesarios cada día para alimentar larvas de organismos en criaderos comerciales. (Lubzens *et al.*,1997;2001). La cantidad necesaria varía de 20,000 a 100,000 rotíferos por larva de pez, durante 20 a 30 días que dura la etapa temprana de desarrollo larval (Kafuku and Ikenoue, 1983; Lubzens *et al.*,2001). Es por ello que la calidad nutricional y mineral de los rotíferos debe ser garantizada y controlada por el uso bien establecido de sistemas y métodos de enriquecimiento a corto y largo plazo.

Artemia franciscana

El progreso de la tasa de alimentación de *Artemia franciscana* con *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo con diferentes formulaciones (**aAIPt4=ALGAL**, **aAARPt4**, **aAEPA4**, **aAEPA8** y **aAEPA16**), desde metanauplio (1 Día Después de la Eclosión DDE) a preadulto (8 DDE), finalizando con el proceso de apareamiento (10 DDE) mostró un incremento en la ración alimenticia de $0,3 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$ a $5,70 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$ por organismo (*figura 15*) lo cual dependió de la transparencia del medio de cultivo, de esta manera todo el alimento adicionado diariamente fue ingerido por *Artemia* (Abreu-Grobois *et al.*,1991;Sorgeloos *et al.*,1994). Se observó entre el día 2 y 3 de cultivo una lenta filtración de la ración alimenticia, corroborada en el conteo celular y transparencia en el medio de cultivo. Tal comportamiento pudo ser debido a manipulación, causante de estrés del organismo, un factor más la ración alimenticia, la cual pudo haber sido excedida en esos primeros días de cultivo; al respecto D'Agostino, 1980; Patiño, 1995 recomiendan una ración alimenticia inicial de 25 μg de microalgas (peso seco x metanauplio de *Artemia*), aunque en el presente estudio solo se administro en el inicio 4,69 μg (**aAIPt4=ALGAL**), 9,98 μg (**aAARPt4**), 8,93 μg (**aAEPA4**), 9,56 μg (**aAEPA8**) y 11,52 μg (**aAEPA16**) de microalgas por organismo debido al peso seco celular de *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con

diferentes formulaciones (tablas 5), considerando lo descrito por Nimura 1963 el cual menciona que elevadas tasas de ingestión pueden retrasar el crecimiento de *Artemia*. Ulterior a este periodo (figura 15) la tasa de filtración de *Artemia franciscana* se incremento de forma casi lineal.

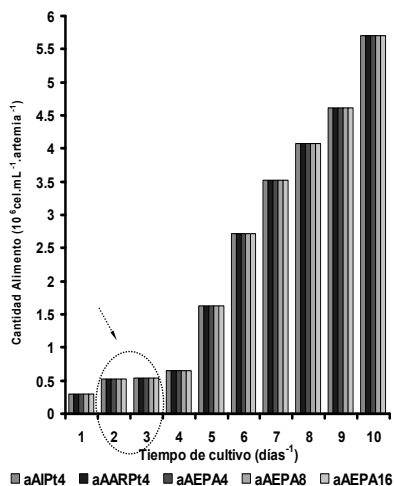


Figura 15.- Evolución del consumo (10⁶cel.mL⁻¹) de *Phaeodactylum tricornutum* (cultivada con diferentes formulaciones) por metanauplios, preadultos y adultos de *Artemia franciscana*

Tocante a la supervivencia de *Artemia* al T₁₀ alimentada con la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* enriquecida mediante las diferentes formulaciones, mostró diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto a el control ($p<0,05$) ver figura 16a y tabla 5; encontrándose valores de 64% (**aAIPt4=ALGAL**), 80% (**aAARPt4**), 85% (**aAEPA4**), 88% (**aAEPA8**) y 91% (**aAEPA16**). Observándose una alta correlación $r^2=0,99$ cuando *Artemia* fue alimentada con la condición **aAEPA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16 mM) ver figura 16b. Indicar que tales valores de supervivencia fueron ligeramente inferiores comparándolos con *Artemia* cultivada con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con el medio de cultivo "ALGAL" reconstituido parcialmente con hierro, azufre, zinc y cobre (capítulo 3) con resultados entre un 73 y 93%; en tanto que con magnesio, calcio, silicio y selenio mostraron ser ligeramente inferiores en torno a 66 y 83% con respecto al presente estudio. Lora-Vilchis *et al.*, 2004 con la diatomea *Chaetoceros gracilis* obtiene una supervivencia del 86%. En tanto que Seixas *et al.*, 2009; Ronsón-Paulín *et al.*, 2009 con diferentes microalgas obtienen porcentajes en torno al 18 y 88%. Por otra parte Dhont and Van Stappen, 2003 indican en diversos sistemas de cultivo en los mismos tiempos que el presente estudio, supervivencias en torno al 45 y 82%. Por otra parte Anh *et al.*, 2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes al día 11 de cultivo mostró supervivencias entre 52 y 54%. La variabilidad en la supervivencia de *Artemia franciscana* dependió como se puede observar del enriquecimiento y calidad de la microalga con que fue alimentada, la cual además influyo en el tiempo en el cual *Artemia* llego a su etapa adulta (8 DDE) y con ella al apareamiento (10 DDE) del 100% de los adultos, donde las hembras ya poseían desarrollado el ovisaco. Anh *et al.*, 2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes demostró al día 14 de cultivo una tasa de maduración entre el 95,2 y 99,7%.

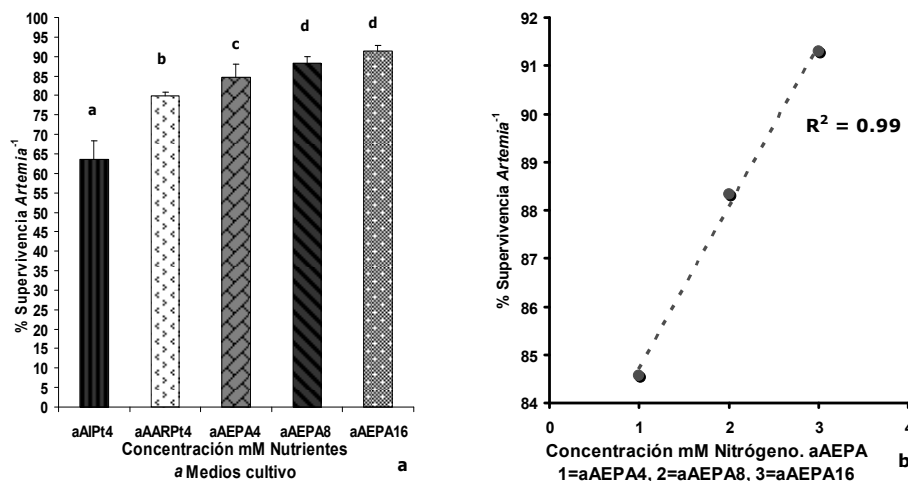


Figura 16.- Supervivencia de *Artemia franciscana* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* (cultivada y enriquecida con diferentes medios de cultivo) (**a**) y coeficiente de correlación supervivencia con las condiciones **aAEPA** 4, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$)

Los adultos de *Artemia franciscana* al T_{10} de experimentación alcanzaron la siguiente longitud total (LT) por organismo: 6,17mm (**aAIPt4=ALGAL**), 7,33mm (**aAARPt4**), 8,70mm (**aAEPA4**), 9,53mm (**aAEPA8**) y 9,81mm (**aAEPA16**), indicando los resultados la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto a el control ($p<0,05$) ver figura 17a. Destacar que se logro obtener un índice de correlación $r^2=0,92$ con una tendencia lineal positiva en la LT cuando *Artemia* es alimentada con la condición de cultivo **aAEPA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM), ver figura 17b. Mencionar además que los presentes resultados superan en rendimiento a los obtenidos en el capítulo 3; los cuales estuvieron en torno a 6,04 y 9,33 mm^{-1} por adulto de *Artemia*. Lora-Vilchis *et al.*, 2004 alimentando *Artemia* por 7 días con la diatomea *Chaetoceros gracilis* obtuvo tallas de solo 6,0 mm^{-1} . En tanto que Seixas *et al.*, 2009 alimentando con *Rhodomonas lens*, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana* y *Nannocloropsis gaditana* al T_8 obtuvo una LT en torno a 1,5 y 4,9 mm. Por otra parte Anh *et al.*, 2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes demostró valores por abajo de los nuestros al día 14 de cultivo, demostrando una LT en el rango de 8,8 y 9,4mm, en tanto que Ronsón-Paulín *et al.*, 2009 al día 14 de cultivo con *Tetraselmis suecica*, *Nannocloropsis* sp y mezcla de estas con y sin probióticos obtiene tallas entre 5,2 y 7,65 mm por individuo. Sin embargo Dhont and Van Stappen, 2003 citan que después de 2 semanas de cultivo con diferentes dietas vivas o inertes es posible que los preadultos o adultos de *Artemia* en promedio posean una longitud de 5 mm; nuestros resultados superan dichos valores al T_{10} . Fábregas *et al.*, 1996, 1998; Evjemo and Olsen, 1999, señalan que diferentes concentraciones de alimento influyen sobre el crecimiento y la reproducción de *Artemia franciscana*; en el presente estudio para todas las condiciones de cultivo probadas, las tasas de alimentación fueron las mismas, alterándose solo la calidad de la dieta vía el enriquecimiento con las diferentes formulaciones de cultivo, lo que nos demostró que la variabilidad de tallas es reflejo de la diversidad en la nutrición mineral.

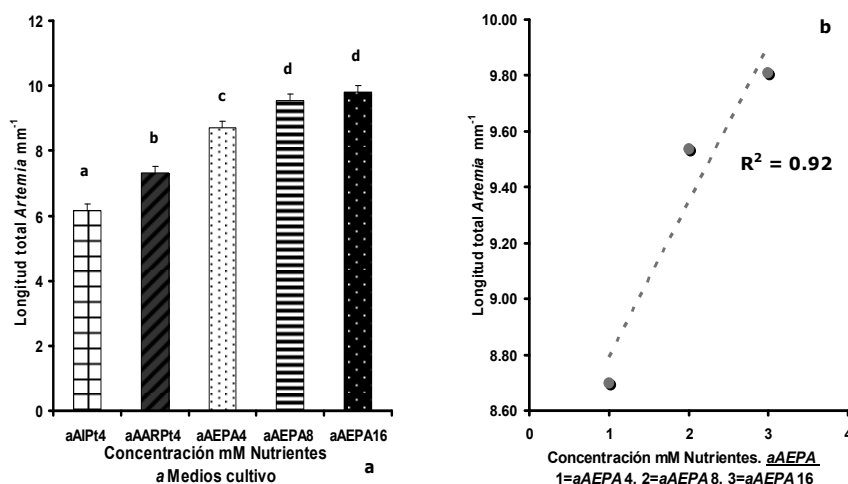


Figura 17.- Longitud total (LT) de *Artemia franciscana* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* (cultivada y enriquecida con diferentes medios de cultivo) **(a)** y coeficiente de correlación LT con las condiciones **aAEPA** 4, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$)

En lo que se refiere a la tasa de conversión alimenticia (TCA) y porcentaje de eficiencia de crecimiento (%EC), por *Artemia* al tiempo T_{10} , alimentada con la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* enriquecida con las diferentes formulaciones, fue muy variable, mostrando los siguientes valores : **aAIPt4=ALGAL**(2,14-46,68%), **aAARPt4**(3,37-29,68%), **aAEPA4**(2,00-49,90%), **aAEPA8**(2,26-44,19%) y **aAEPA16**(3,94-25,39%) indicándonos en ambos casos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) ver *figura 18a*. Subrayar que *Artemia* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con la formulación **aAEPA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) mostró un coeficiente de correlación $r^2=0,85$ en la TCA, con ajuste a una tendencia lineal positiva, en tanto que con respecto al %EC se obtuvo una $r^2=0,91$ con ajuste a una tendencia lineal negativa (*figura 18b*). Indicar que resultados de TCA de *Artemia* obtenidos en el capítulo 3 de la presente disertación, mostraron valores en torno a 2,28 y 4,48, los cuales se encuentran por encima de los registrados en el presente estudio, lo que nos indica que la TCA es menos eficiente con respecto a la descrita en el presente estudio, sin embargo con la dieta modificada con zinc se obtuvo un valor de 1,84 que fue mucho más eficiente con respecto a las condiciones **aAIPt4=ALGAL**(2,14), **aAEPA4**(2,00) y **aAEPA8**(2,26) (*figura 18a*); por lo que respecta a el %EC en *Artemia* encontrada en el capítulo 3 en las condiciones magnesio, silicio, selenio, hierro y cobre en el rango de 22,31 y 36,31% demostraron ser valores inferiores en rendimiento a los encontrados en el presente estudio, aunque en condiciones como el calcio (40,35), cobre (43,70) y zinc (54,20) se demostró un rendimiento muy similar en *Artemias* de las condiciones **aAIPt4=ALGAL**(46,68%), **aAEPA4**(49,90%) y **aAEPA8**(44,19%). Los valores de TCA nos indican cuan eficiente es *Artemia* vía la microalga enriquecida con las diferentes formulaciones de cultivo para ganar peso o crecer; Lora-Vilchis *et al.*,2004 alimentando con la diatomea *Chaetoceros gracilis* obtiene TCA de 2,23 valores comparables en eficiencia con los demostrados en el presente estudio. Sin embargo Seixas *et al.*,2009

alimentando con *Rhodomonas lens* y *Tetraselmis suecica* obtiene mayores TCA entre 6,5 y 6,2 respectivamente. El comportamiento de las anteriores variables nos da una idea de cuan importante es la formulación de un medio de cultivo microalgal el cual desemboca en la calidad del alimento vía la cadena trófica y su desempeño nutricional sobre variables operacionales de cultivo.

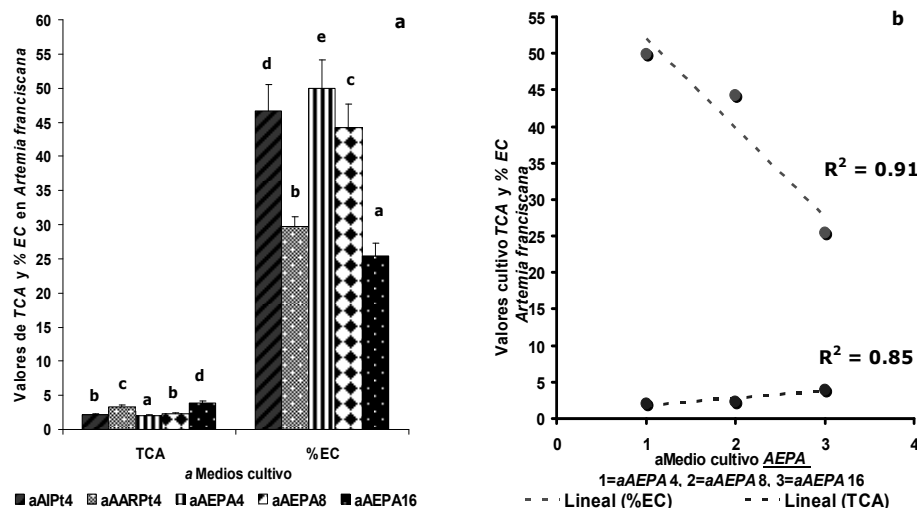


Figura 18.- Tasa de conversión alimenticia (TCA) y porcentaje de eficiencia de crecimiento (%EC) de *Artemia franciscana* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* (cultivada y enriquecida con diferentes medios de cultivo) **(a)** y coeficiente de correlación TCA y %EC con la condición **aAEPA** 4, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$)

La calidad de *Phaeodactylum tricornutum* debida al cultivo e enriquecimiento con diferentes formulaciones, demostró diferentes velocidades de crecimiento (VC) en *Artemia* de: 0,56 mm.día⁻¹ (**aAIPt4=ALGAL**), 0,67 mm.día⁻¹ (**aAARPt4**), 0,79 mm.día⁻¹ (**aAEPA4**), 0,87 mm.día⁻¹ (**aAEPA8**), 0,89 mm.día⁻¹ (**aAEPA16**), demostrándonos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre **aAEPA8** y **aAEPA16**, siendo estas ultimas, las mejores velocidades de crecimiento. Tales VC mostraron un mejor rendimiento con respecto a las encontradas en el capítulo 3. Lora-Vilchis *et al.*, 2004 en su estudio sobre la tasa de crecimiento en *Artemia* con diferentes dietas obtiene con la diatomea *Chaetoceros gracilis* velocidades de crecimiento inferiores a nuestros resultados en el rango de 0,44 y 0,56 mm.día⁻¹. Sick 1976 indica que altas VC en *Artemia* alimentada con *Dunaliella viridis* son debidas a la ausencia de pared celular, al alto contenido de proteína celular y contenido energético, sin embargo *Phaeodactylum tricornutum* posee una pared celular rígida lo que nos muestra que esta y las anteriores características no son las únicas razones por las cuales el alto valor alimenticio de una microalga, debiéndose agregar que en el presente estudio el enriquecimiento mineral de la dieta es un factor más el cual influye en el valor alimenticio de la dieta y por ende en el siguiente nivel trófico.

El peso seco (PS) ganado por los adultos de *Artemia franciscana* en base a las diferentes condiciones de cultivo en *Phaeodactylum tricornutum* fue muy variable obteniéndose los siguientes resultados al T₁₀: 172,98 μ g.artemia⁻¹ (**aAIPt4=ALGAL**),

234,22 $\mu\text{g.} \text{artemia}^{-1}$ (**aAARPt4**), 352,46 $\mu\text{g.} \text{artemia}^{-1}$ (**aAEPA4**), 334,78 $\mu\text{g.} \text{artemia}^{-1}$ (**aAEPA8**) y 231,38 $\mu\text{g.} \text{artemia}^{-1}$ (**aAEPA16**) (tabla 5); indicándonos en todos los casos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) ver figura 19a. *Artemia* cultivada con la condición **aAEPA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) reveló un coeficiente de correlación $r^2=0,86$ con ajuste a una tendencia lineal negativa en la generación de PS (figura 19b). Indicar que resultados de PS de las condiciones **aAEPA4** y **aAEPA8** fueron superiores a los obtenidos en organismos alimentados con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes elementos (capítulo 3 en torno a 139,19 y 261.41 $\mu\text{g.} \text{artemia}^{-1}$), excepto con el zinc (348,16 $\mu\text{g.} \text{artemia}^{-1}$) que mostró ser muy similar en rendimiento a la condición **aAEPA4**. Los valores de peso seco del presente estudio se correspondieron con la evolución de el peso orgánico (proteínas+lípidos+carbohidratos $\mu\text{g.} \text{artemia}^{-1}$, tabla 5) en el rango de 220,55-332,51 y por ende con el contenido de materia orgánica por adulto de *Artemia* (tabla 5). Lora-Vilchis *et al.*,2004 alimentando *Artemia* con la diatomea *Chaetoceros gracilis* obtuvo al día 7 un peso orgánico de 252,9 $\mu\text{g.} \text{artemia}^{-1}$, Seixas *et al.*,2009 alimentando con *Nannocloropsis gaditana*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* y *Rhodomonas lens* al T₈ obtuvo pesos entre 25,7 y 111,2 $\mu\text{g.} \text{artemia}^{-1}$. Por otra parte Anh *et al.*,2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes al día 5 de cultivo obtiene pesos entre 310 y 320 $\mu\text{g.} \text{artemia}^{-1}$. Ronsón-Paulín *et al.*,2009 al día 14 de cultivo con *Tetraselmis suecica*, *Nannocloropsis* sp y mezcla de estas con y sin probióticos obtiene pesos entre 140 y 470 $\mu\text{g.} \text{artemia}^{-1}$. Resultados que nos indican que la variabilidad en la calidad nutritiva de la microalga influye en la nutrición y crecimiento del organismo; calidad nutricional que en nuestro estudio fue posible modificar vía el enriquecimiento mineral de la microalga con las formulaciones de cultivo, lo cual impacto en el desempeño nutricional de *Artemia* para la generación de peso.

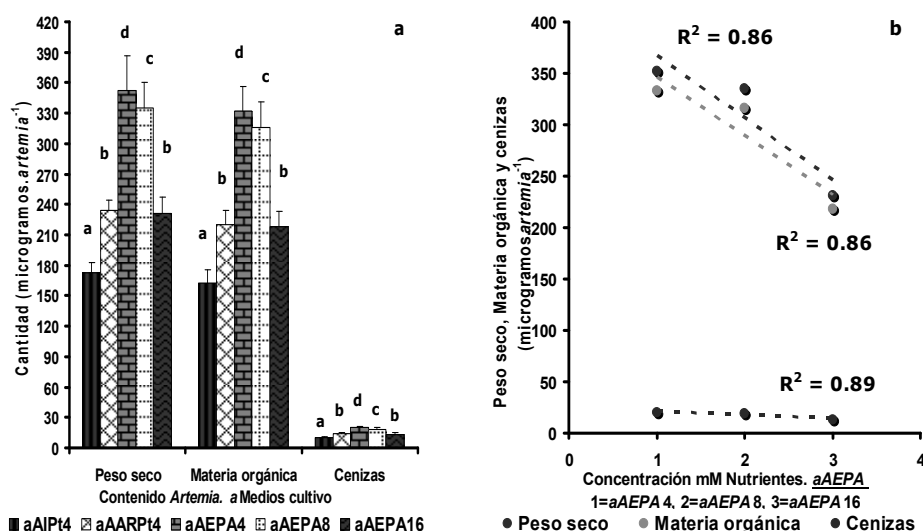


Figura 19.- (a) Contenido *Artemia*: peso seco, materia orgánica y cenizas ($\mu\text{g.} \text{artemia}^{-1}$) alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo con respecto a los diferentes medios de cultivo. **(b)** Correlación concentración nutrientes medio de cultivo **aAEPA**. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

La incorporación de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} y Cu^{2+} por los adultos de *Artemia franciscana* vía *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes formulaciones, se puede observar en la figuras 20 a-b, 21 a-b y tablas 6-7; como se puede observar tales resultados fueron muy variables, lo que nos indicó la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones ($p<0,05$). Tales diferencias concuerdan con la variabilidad de cenizas reportadas en todas las condiciones de cultivo del microcrustáceo, que además son evidentes en el comportamiento del peso seco y orgánico de *Artemia* vía el alimento. Reinfelder *et al.*,1998, sugieren que la bioacumulación de un elemento se basa en modelos conceptuales sencillos en donde la concentración del elemento en el organismo esta controlada por el equilibrio entre el consumo, eliminación y crecimiento, tal y como ocurre en bivalvos, copépodos, rotíferos y *Artemia* (Wang and Fisher, 1998) y como vía de bioacumulación las microalgas (Lee and Luoma, 1998).

La eficiencia de asimilación en los hidrobiontes es directamente proporcional al contenido citoplasmático del elemento en las células microalgales que sirven de alimento en copépodos y larvas de bivalvos (Reinfelder and Fisher, 1991;1994; Hutchins *et al.*,1995). La eficacia de *Artemia* como un transportador de bioproductos de importancia dietética en niveles superiores de la cadena trófica es posible, por ejemplo productos liposolubles administrados a través de una emulsión, compuestos solubles en agua a través de liposomas (Hontoria *et al.*,1994; Tonheim *et al.*,2000; Monroig *et al.*, 2003, 2006; Nordgreen *et al.*,2007) portador de microcápsulas (Sakamoto *et al.*,1982; Medina-Reyna *et al.*,2002a, b, c; Medina-Reyna *et al.*,2005); y como demuestra el presente estudio el transporte y bioacumulación indirecta o directa de los anteriores elementos minerales (así como el manganeso) importantes en marcados procesos fisiológicos, de salud, antistress y limitatorios de deformaciones esqueléticas en estadios tempranos y postlarvales de diferentes especies marinas (Lall and Lewis-McCrea, 2007; Nguyen *et al.*,2008, Rider *et al.*,2009).

El enriquecimiento mineral vía la cadena trófica incluso modifica la composición de ácidos grasos y supervivencia de larvas de pargo; lo que sería una importante herramienta biotecnológica a fin de mejorar la calidad de la cría larvaria de peces marinos en laboratorio. La utilidad del método de bioencapsulación por *Artemia* queda comprobada por su análisis químico.

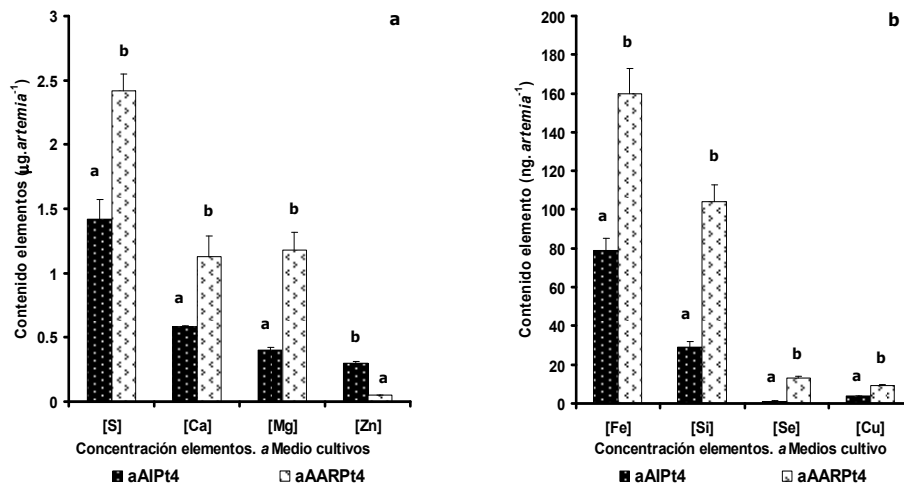


Figura 20. Incorporación de elementos por *Artemia franciscana* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum*, en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con **aAARPt4** y **aAIPt4**: **(a)** S²⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, **(b)** Fe³⁺, Si⁴⁺, Se²⁻, Cu²⁺. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

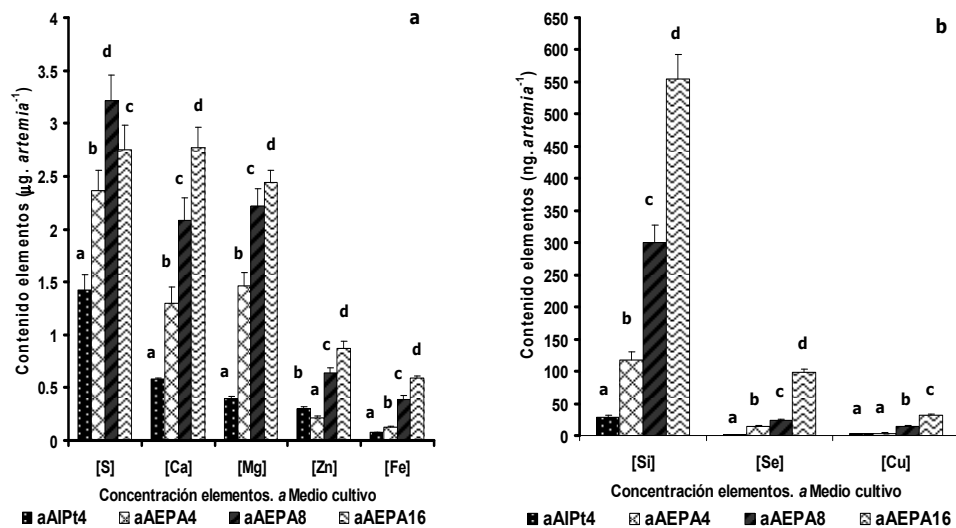


Figura 21.-Incorporación de elementos en *Artemia franciscana* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum*, en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con **aAIPt4**, **aAEPA4**, 8 y 16mM: **(a)** S²⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺ **(b)** Si⁴⁺, Se²⁻, Cu²⁺. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

Demostrar que el caso del medio de cultivo **aAEPA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8, 16mM) se obtuvieron coeficientes de correlación en la incorporación de Ca²⁺, Fe³⁺ y Zn²⁺ de $r^2=0,99$, $0,99$ y $0,97$ respectivamente en todos los casos con ajuste a una tendencia lineal positiva, en tanto que para S²⁻ y Mg²⁺ una $r^2=1$ en ambos casos, con un ajuste a una tendencia polinomial negativa (figura 22a). Por lo que respecta al Si⁴⁺, Se²⁻ y Cu²⁺ mostraron una r^2 de $0,99$, $0,83$ y $0,99$ con ajuste a una tendencia lineal positiva (figura 22b).

Ciertos minerales como el calcio, fósforo, boro, zinc, cobre, silicio, vanadio, selenio, manganeso estroncio y fluor son necesarios para el normal mantenimiento de las funciones

metabólicas y fisiológicas de los organismos vivos. Las principales funciones de los elementos esenciales en el cuerpo del animal incluyen la formación de estructuras esqueléticas, mineralización, mantenimiento de sistemas coloidales, regulación del equilibrio ácido-base, así como el ser componentes importantes de las hormonas, enzimas y proteínas estructurales (Simkiss, 1979; Williams, 1981; Lall, 2002; Lall and Lewis-McCrea, 2007). Villanueva and Bustamente, 2006 mencionan que en la crianza de paralarvas de pulpo con *Artemia*, la presa poseía un contenido de cobre, zinc, magnesio y azufre relativamente bajo, el cual es casi la mitad del perfil encontrado en paralarvas silvestres, lo que sugiere un efecto de la dieta y/o indicación de el pobre estado fisiológico de las paralarvas alimentadas con *Artemia*, indicando que requieren un alimento rico en tales elementos, es con base en lo anterior que el presente estudio representa una ideal herramienta para revertir deficiencias minerales en el alimento vivo las cuales desemboquen en incrementar tasas de metamorfosis y supervivencia.

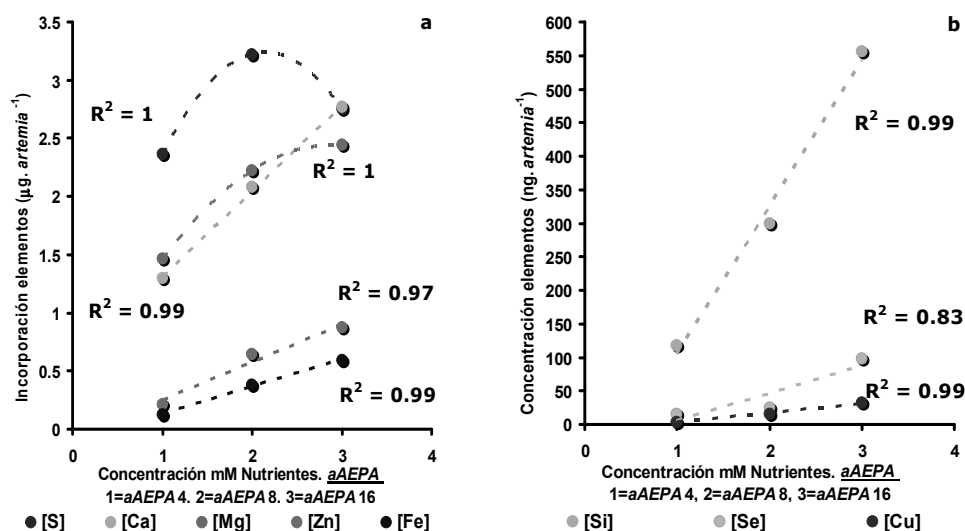


Figura 22.- Coeficientes de correlación en la incorporación de elementos por *Artemia franciscana* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con el medio **aAEPA** 4, 8 y 16mM: **(a)** S²⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺ **(b)** Si⁴⁺, Se²⁻, Cu²⁺. Media \pm SD ($n=3$).

Las diferentes formulaciones de cultivo en *Phaeodactylum tricornutum* produjeron diferentes efectos como alimento en la composición bioquímica de *Artemia franciscana* de la siguiente manera: la biomasa celular con los medios **AIPT4=ALGAL**, **AARPt4** mostró la siguiente disposición bioquímica **Lípidos>Proteínas>Carbohidratos**(pg.cel⁻¹), en tanto que en *Artemia* una vez consumida las microalgas la disposición fue **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos**($\mu\text{g. artemia}^{-1}$) en ambos casos (figura 23 a-b); en el caso de la biomasa celular con **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16** reveló el siguiente orden en la composición proximal **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos** (pg.cel⁻¹), y una vez consumida la microalga por *Artemia* **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos** ($\mu\text{g. artemia}^{-1}$) en la totalidad de los casos (figura 24a-b).

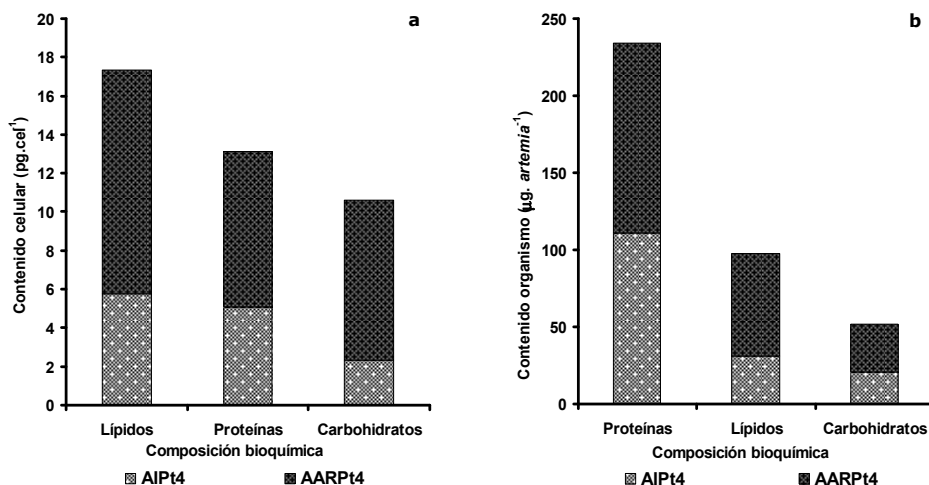


Figura 23. (a) Composición bioquímica de *Artemia franciscana* ($\mu\text{g.artemia}^{-1}$) alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* (pg.cel^{-1}) **(b)** cultivada con **AIpt4=ALGAL** y **AARPt4**.

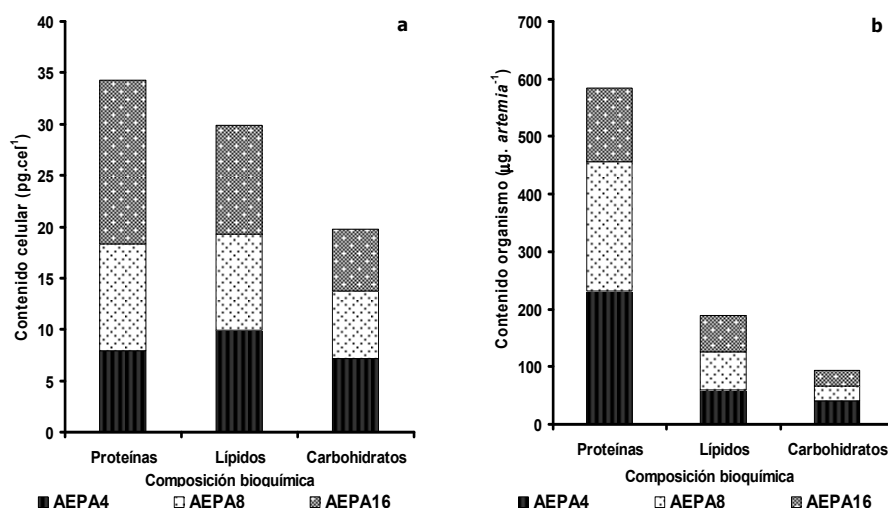


Figura 24. (b) Composición bioquímica de *Artemia franciscana* ($\mu\text{g.artemia}^{-1}$) alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* (pg.cel^{-1}) **(a)** cultivada con **AEPA 4, 8 y 16mM**.

En orden de importancia energética el contenido de proteína en *Artemia franciscana* fue el mayor combustible bioquímico (figura 24 b), una vez alimentada con la microalga, cultivada con diferentes formulaciones, mostrando los siguientes valores: $110,92\mu\text{g.artemia}^{-1}$ (**aAIpt4=ALGAL**), $123,13\mu\text{g.artemia}^{-1}$ (**aAARPt4**), $240,12\mu\text{g.artemia}^{-1}$ (**aAEPA4**), $224,48\mu\text{g.artemia}^{-1}$ (**aAEPA8**) y $127,90\mu\text{g.artemia}^{-1}$ (**aAEPA16**) comparativamente; existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) ver tabla 5 y figura 25a. Por otra parte la condición **aAEPA 4, 8 y 16** reveló un coeficiente de correlación proteico con respecto a la concentración de nutrientes $r^2=0,85$ con ajuste a una tendencia lineal negativa (figura 25b) .

Indicar que las condiciones **aAEPA4** y **aAEPA8** mostraron un mejor rendimiento proteico, comparado con resultados obtenidos en el capítulo 3 de la presente disertación en donde organismos alimentados con las condiciones magnesio, silicio, selenio, hierro, cobre, azufre y calcio expresaron solo un rendimiento entre 101,09 y 141,21 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$, en tanto que la condición zinc con 232,02 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ resulto con un rendimiento muy cercano a las condiciones ya mencionadas en el presente estudio.

En tanto que el segundo combustible lo constituyó el contenido de lípidos (*figura 24 b*) con los siguientes valores: 31,16 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (**aAIpt4=ALGAL**), 66,40 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (**aAARPt4**), 60,31 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (**aAEPA4**), 65,04 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (**aAEPA8**) y 63,47 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (**aAEPA16**) (*tabla 5*), indicando diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre las condiciones **aAARPt4** y **aAEPA8** ver *tabla 5* y *figura 25a*. La condición **aAEPA 4, 8 y 16** reveló un coeficiente de correlación lipídico con respecto a la concentración de nutrientes $r^2=1$ con ajuste a una tendencia lineal positiva (*figura 25b*). Decir que las condiciones **aAARPt4**, **aAEPA4**, **aAEPA8** y **aAEPA16** revelaron un mejor rendimiento lipídico, comparado con resultados obtenidos en el capítulo 3 de la presente disertación en donde organismos alimentados con las condiciones magnesio, selenio, silicio, hierro y cobre indicaron solo un rendimiento entre 30,08 y 55,34 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$, en tanto que condiciones como zinc, azufre y calcio con valores de 65,11, 66,98 y 68,76 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ resultaron poseer rendimiento muy cercano a las condiciones ya mencionadas en el presente capítulo.

Por lo que concierne a los carbohidratos (CHOs) (*figura 24 b*) valores de 20,96, 31,02, 40,18, 26,61 y 26,71 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ estuvieron presentes en **aAIpt4**, **aAARPt4**, **aAEPA4**, **aAEPA8** y **aAEPA16** comparativamente (*tabla 5*); indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre **aAEPA8** y **aAEPA16** ver *tabla 5* y *figura 25a*. Mencionar que el tratamiento **aAEPA 4, 8 y 16** reveló un coeficiente de correlación (CHOs) con respecto a la concentración de nutrientes $r^2=0,74$ con ajuste a una tendencia lineal negativa (*figura 25b*). Señalar que las condiciones **aAARPt4**, **aAEPA8** y **aAEPA16** revelaron rendimiento de carbohidratos muy similares a las obtenidos en el capítulo 3 de la presente disertación en organismos alimentados con las condiciones magnesio, selenio, silicio, hierro, calcio, hierro y cobre en torno a 23,78 y 34,31 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$, en tanto que con el tratamiento azufre con valor de 40,85 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ resultaron poseer un rendimiento muy cercano a el tratamiento **aAARPt4**.

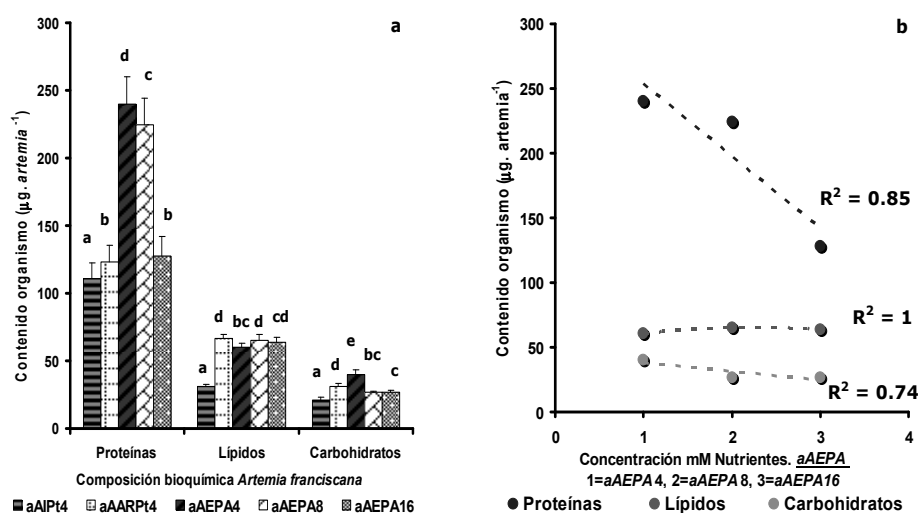


Figura 25. (a) Contenido *Artemia franciscana* (µg.*artemia*⁻¹) de proteínas, carbohidratos y lípidos, alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficientes de correlación *aAEPA4,8,16*. Media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p < 0,05$).

Cuando se consideró el contenido de proteína, como porcentaje de la fracción orgánica, se observaron los siguientes valores: 68,03% (*aAIPt4=ALGAL*), 55,83% (*aAARPt4*), 70,49% (*aAEPA4*), 71,01% (*aAEPA8*) y 58,65% (*aAEPA16*) ver figura 26 y tabla 5. Dichos porcentajes de proteína en *Artemia franciscana* fueron muy similares a los descritos en el capítulo 3, donde se obtuvieron valores en torno al 54,12 y 70,70%. Seixas *et al.*, 2009 en juveniles de 5 días alimentados con *Tetraselmis suecica* y *Rhodomonas lens* obtuvieron entre un 63 y 68% respectivamente, en tanto que Anh *et al.*, 2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes describe entre un 55 y 56%. Los valores del presente estudio superan a los descritos por Dhont and Van Stappen, 2003 para adultos de *Artemia* con un 39-67%. Los adultos de *Artemia* poseen una mayor cantidad de proteína que los nauplios, esto es debido a la dieta; así como un mayor contenido de los 10 principales aminoácidos esenciales, y que son considerados como necesarios por las larvas de peces.

En comparación con los lípidos, muy poca investigación se ha realizado sobre el papel y necesidades de proteínas en la nutrición larval, a pesar del hecho de que el catabolismo de los aminoácidos es la mayor fuente de energía en larvas de peces (Dabrowski 1983) y que los aminoácidos son esenciales para la síntesis de proteínas y enzimas (Conceição 1997). Por otra parte, las larvas parecen tener mayores necesidades de aminoácidos que los peces juveniles o adultos (Dabrowski 1986; Fiogbé and Kestemont 1995). Aunque se cree que *Artemia* contiene niveles adecuados de la mayoría de los aminoácidos, la fracción de aminoácidos libres es baja en comparación con los niveles de copépodos silvestres (Tonheim *et al.*, 2000), especialmente en metionina. Conceição *et al.*, 1997 observaron el retraso en el crecimiento en larvas de rodaballo alimentados con *Artemia* y se sospecha es relacionado con la deficiencia de metionina.

En lo que se refiere a la fracción orgánica de los lípidos (ver figura 26 y tabla 5) estos revelaron los siguientes porcentajes: 19,11% (**aAIPt4=ALGAL**), 30,10% (**aAARPt4**), 17,70% (**aAEPA4**), 20,57% (**aAEPA8**) y 29,10% (**aAEPA16**). Donde las condiciones de cultivo **aAARPt4**, y **aAEPA16** indicaron un mejor rendimiento lipídico con respecto a los resultados obtenidos en el capítulo 3 de la presente disertación, en *Artemia* alimentada con las condiciones azufre(28,41%), silicio(25,68%) y calcio (28,17%), en tanto que la condición **aAEPA8** se encontró por encima de los tratamientos zinc (19,84%), cobre(18,13%) y hierro (18,74%).

Zhukova et al.,1998 indican que los porcentajes de asimilación de lípidos en *Artemia* responden a la variedad y calidad bioquímica encontrada en la especie microalgal con que fue alimentada; en nuestro estudio tal calidad del alimento dependió de su cultivo con las diferentes formulaciones. *Phaeodactylum tricornutum* es rica en lípidos polares los cuales en *Artemia* después de una semana de alimentación pueden representar hasta un 52% del total de la composición lipídica. Seixas et al.,2009 alimentando juveniles por 5 días con *Rhodomonas lens* y *Tetraselmis suecica* demuestra un contenido lipídico entre el 12 y 15%, Anh et al.,2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes obtiene porcentajes en torno al 14%, en tanto que Dhont and Van Stappen, 2003 citan que varios autores han descrito porcentajes lipídicos en adultos en torno al 4 y 31% y en carbohidratos obtienen entre un 4 y 20%, valores dentro de los cuales caen los resultados para esa fracción en el presente estudio con un comportamiento entre el 8,42 y 14,06% (figura 26 y tablas 5). Anh et al.,2009 reporta porcentajes entre un 14 y 15%.

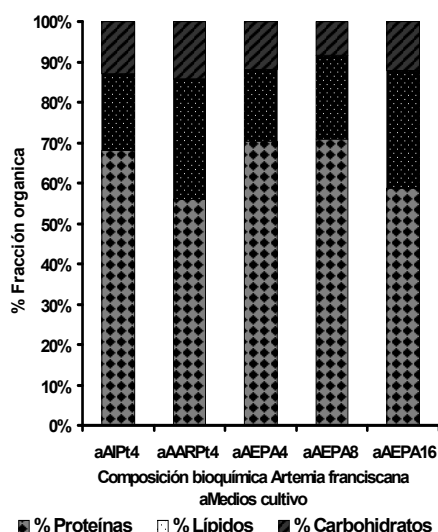


Figura 26.- Fracción orgánica de proteínas, lípidos y carbohidratos en *Artemia franciscana* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo con diferentes medios de cultivo.

En lo que concierne al valor calórico (VC) por *Artemia* en base a la calidad nutricional de *Phaeodactylum tricornutum* vía las diferentes formulaciones de cultivo, se obtuvieron los siguientes resultados: $4,25 \times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$ (**aAIPt4=ALGAL**), $6,11 \times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$ (**aAARPt4**), $8,63 \times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$ (**aAEPA4**), $8,41 \times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$ (**aAEPA8**) y $6,03 \times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$ (**aAEPA16**) indicando la existencia de diferencias altamente significativas

($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) (tabla 5). Observar que los tratamientos **aAEPA4** y **aAEPA8** mostraron un VC superior al obtenido en el capítulo 3, en *Artemia* alimentada con las condiciones silicio ($5,80 \times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$), selenio ($4,40 \times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$), magnesio ($4,45 \times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$), cobre ($4,26 \times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$) y hierro ($4,43 \times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$), en tanto que con zinc ($8,67 \times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$) fue muy similar. Por lo que respecta a los tratamientos con azufre ($6,41 \times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$), y calcio ($6,70 \times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$) demostraron ser ligeramente superiores a los valores obtenidos con **aAARPt4** y **aAEPA16**. Los valores aquí descritos de VC superan los referidos por Seixas *et al.*, 2009 en su estudio de alimentación con *Tetraselmis suecica* y *Rhodomonas lens* al T₅ con 1,16 y 1,35 $\times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$. Demostrando nuestros resultados que la calidad del alimento de *Artemia* vía el enriquecimiento mineral en la microalga, dadas las diversas formulaciones demuestra disímiles grados de calidad de *Artemia* en cultivo.

El contenido de ácidos grasos en *Artemia franciscana* fue modulado por la calidad de *Phaeodactylum tricornutum* (Frolov *et al.*, 1991; Robin, 1995; Zhukova *et al.*, 1998) cultivada y enriquecida con diferentes formulaciones (capítulo 7); donde los ácidos grasos (AG) más abundantes entre un 6,99 y 58,26% están representados por el 14:0, 16:0 y el 16:1(n-7), estimándose en conjunto en un 56,71-72,65% del total. Resultados que son ligeramente inferiores a los descritos en el capítulo 3 (57,84-76,07%) de la presente disertación. Dichos valores superan los establecidos por Dhont and Van Stappen, 2003, con un 40-60% obtenidos con diversos tipos y calidad de la dieta. Seixas *et al.*, 2009 mencionan que alimentando con diferentes microalgas el ácido graso saturado más abundante es el 16:0. Léger *et al.*, 1986 menciona que son varias las publicaciones que incluyen 15 o más diferentes ácidos grasos, pero únicamente seis (16:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3 y 20:5n-3) de ellos representan alrededor del 80% del total de AG en una muestra de *Artemia*. En el presente estudio derivado de las diferentes formulaciones de cultivo hallamos entre 70,76 y 81,12% (tabla 8). Otros AG monoinsaturados y poliinsaturados en conjunto de cadena corta entre un 19,42 y 33,0% son el 16:2(n-6), 16:2(n-4), 16:3(n-3), 18:0, 18:1(n-9), 18:1(n-7), 18:2(n-6) (Léger *et al.*, 1986; Zhukova *et al.*, 1998) resultados muy similares fueron descritos en el capítulo 3 (20,11 y 34,67%). Estevez *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2000 mencionan que algunos autores también han detectado niveles significativos del AG 18:1n-7, el cual en el presente estudio estuvo presente entre el 3,64 y 6,19% (tabla 8), valores que son debidos probablemente reflejo de una mayor resolución cromatográfica. El ácido oleico (18:1n-9) es otro de los AG más abundantes (Støttrup and McEvoy, 2003), el cual en este estudio fue detectado entre un 8,62 y 14,69%. En tanto ácidos grasos en conjunto con más de 20 carbonos representando un rango de entre 5,82 y 8,84% (tabla 8) están los AG 20:4(n-6 AA), 20:5(n-3 EPA) y 22:6(n-3 DHA), valores ligeramente inferiores a los obtenidos en el capítulo 3 (4,35 y 9,95%). Donde además el AG AA fue posible detectarlo entre un 0,22 y 0,46%, concentración muy similar describe Seixas *et al.*, 2009, alimentando con otras microalgas (0,4%). Destacar que el ácido graso 22:6(n-3) no aparecía como detectable en la biomasa microalgal, al respecto Zhukova *et al.*, 1998, indican que el metabolismo de los lípidos en *Artemia* es poco conocido ya que se ha observado la capacidad de este microcrustáceo para poder sintetizar mayores cantidades *de novo* del 16:0 y 18:0, que los

encontrados en la dieta y elongar a partir del 18:2(n-6) hacia ácidos grasos de cadena mas larga como ocurre con algunos crustáceos. Dada la diversidad elemental de las formulaciones probadas en el cultivo de *Phaeodactylum tricornutum* que sirvió como alimento de *Artemia franciscana* es que se observaron diversos grados de evolución respecto a incrementar o decrecer porcentualmente tales AG en dichos organismos.

En el presente estudio destaca por su concentración el ácido graso eicosapentaenoico (20:5(n-3) EPA) (Dunstan *et al.*,1994; Ying *et al.*,2000) que forma parte del equilibrio en la formación de eicosanoides (Dyeberg, 1986; Sargent *et al.*,1993) en larvas tempranas de organismos marinos; los eicosanoides formados desde EPA son menos activos biológicamente que los eicosanoides derivados de ARA, sin embargo EPA es importante en la modulación de producción de eicosanoides por competir por los mismos sistemas enzimáticos que convierten ARA a eicosanoides (Sargent, 1995); y así mismo contribuir en el equilibrio con el DHA a procesos de normal pigmentación.

El AG eicosapentaenóico (EPA) en *Artemia* fue acumulado en base a las diferentes dietas de la siguiente forma: 6,34% (**aAIpt4=ALGAL**), 6,54% (**aAARPt4**), 8,49% (**aAEPA4**), 6,35% (**aAEPA8**) y 5,56% (**aAEPA16**) indicándonos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre **aAIpt4=ALGAL** y **aAEPA8**, *tablas 8* y *figura 27a*. Se observo un decremento del contenido de EPA con respecto a un incremento de nutrientes de la dieta **aAEPA** (4, 8 y 16mM), lo cual se ajusto a una tendencia lineal negativa con un coeficiente de correlación $r^2=0,94$ (*figura 27b*). Indicar que en el capítulo 3, *Artemia* alimentada con las condiciones Mg^{2+} (5,71%), Ca^{2+} (7,45%), Si^{4+} (4,96%), Se^{2-} (5,54%), Fe^{3+} (6,34%), Cu^{2+} (6,54%) y S^{2-} (8,29%) mostraron un menor rendimiento comparado con el tratamiento **aAEPA4**, sin embargo la condición Zn^{2+} (9,56%) mostró superior rendimiento. Hamre and Harboe, 2008 en equilibrio con ARA y DHA y un 9% de EPA enriquecido en *Artemia* logra una normal pigmentación de larvas de *Hippoglossus hippoglossus*. Indicar que el contenido porcentual de EPA en las dietas cultivadas con las diferentes formulaciones (capítulo 7); en la mayoría de los casos estuvieron por encima de los valores porcentuales encontrados en *Artemia* una vez alimentadas (*tablas 8*) con dichas dietas; tal variación es debida a que este microcrustáceo posee una marcada propensión a retroconvertir ácidos grasos de cadena larga a corta (Evjemo *et al.*,1997; Navarro *et al.*, 1999) tanto en cantidad como en calidad en función del tiempo de enriquecimiento o alimentación, lo que nos indicaría que los emplea en procesos de crecimiento y maduración sexual, que son indicativos de los valores ya descritos de TCA y %EC. Sin embargo a pesar de dichos procesos de desenlongación, son valores superiores a los descritos por Seixas *et al.*,2009, los cuales alimentando con *Tetraselmis suecica* y *Rhodomonas lens* refieren valores de 4,2 y 6,2% de EPA.

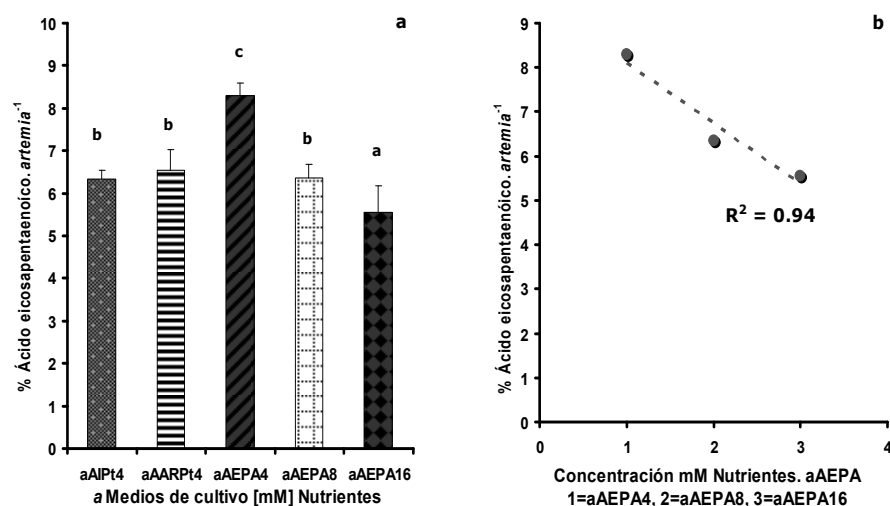


Figura 27. Contenido de Ácido eicosapentaenóico en *Artemia franciscana* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%. día⁻¹ con diferentes medios de cultivo (a) y coeficientes de correlación EPA con el medio aAEPA4, 8 y 16mM (b). Media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa (p<0,05).

El contenido de AGT $\mu\text{g. artemia}^{-1}$ que correspondió del contenido lipídico de *Artemia franciscana*, alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada e enriquecida con las diferentes formulaciones fue el siguiente: **aAIPT4=ALGAL**(90,36%), **aAARPt4**(53,37%), **aAEPA4**(31,69%), **aAEPA8**(59,50%) y **aAEPA16**(70,30%). Donde las condiciones **aAEPA8** y **aAEPA16** mostraron estar en el rango de AGT descrito en el capítulo 3 para los tratamientos con calcio, silicio, selenio, azufre y zinc (55,48 y 68,53%), en tanto que con magnesio(94,50%), hierro(87,33%) y cobre(97,87) mostraron un mejor rendimiento. Bell *et al.*, 2003, mencionan que existen dificultades en el apropiado enriquecimiento de *Artemia* con EPA y DHA lo que es un importante obstáculo para su idoneidad como presa viva en la alimentación de larvas de peces marinos. La pobre capacidad de enriquecimiento con EPA y DHA puede ser explicada por el alto contenido de lípidos libres antes y después del enriquecimiento especialmente triacilglicerol, con pequeñas concentraciones de monoacilglicerol, diacilglicerol, esterol, esterol esterol, y en particular ácidos grasos libres de escaso valor nutritivo (Takeuchi *et al.*, 1992; McEvoy *et al.*, 1996); que en el presente estudio fueron corregidos mediante la calidad y riqueza de fosfolípidos por *Phaeodactylum tricornutum* cultivada y enriquecida con diferentes formulaciones. Es en base a nuestros resultados que observamos cuan importante y motivo de variabilidad, resulta ser la complejidad elemental en la modificación del perfil bioquímico en la cadena trófica. Dhont and Van Stappen, 2003; McEvoy *et al.*, 1996 mencionan que los tiempos de enriquecimiento o crecimiento en *Artemia* influyen en la calidad y cantidad de los lípidos presentes variando de un 23 a un 17% los fosfolípidos y de un 58 a un 64% los triacilglicerol, situación que nos explicaría el % de AGT sobre el contenido lipídico, hallado en los resultados del presente estudio con respecto a la dieta.

Se encontraron significativas diferencias en el contenido porcentual y $\mu\text{g.} \text{artemia}^{-1}$ de los ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGM) y poliinsaturados (AGP), existiendo en todos los casos diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo experimentadas ($p<0,05$) ver *tabla 8* y *figura 28a*. Señalar que en el caso de la condición **aAEPA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) la evolución de dichos ácidos grasos expresó en el caso de los AGS un coeficiente de correlación $r^2=1$, con ajuste a una tendencia polinomial negativa, en tanto que los AGP indicaron un $r^2=0,70$, con ajuste a una tendencia lineal negativa; en lo que se refiere a los AGM no siguieron algún patrón definido (*figura 28b*).

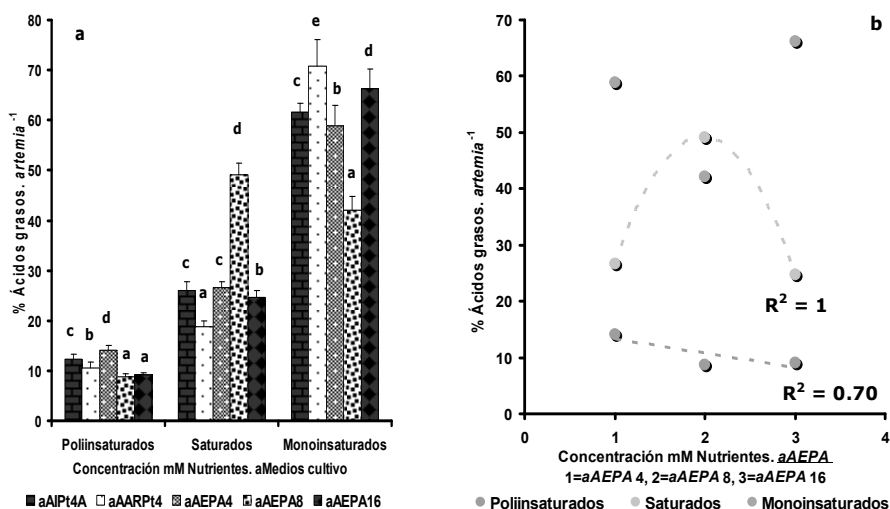


Figura 28. (a) Contenido porcentual de ácidos grasos por *Artemia franciscana* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%. día^{-1} con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficientes de correlación ácidos grasos, condición de cultivo **aAEPA** 4, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

Los AGP se subdividen en tres familias, mediante las cuales se derivan los procesos de elongación y desaturación mediante las series $\omega-9$, $\omega-6$ y $\omega-3$; de los cuales las series importantes son la $\omega-3$ y $\omega-6$, así mismo la proporción entre estas dos series es de relevante importancia en el valor energético en cada uno de los niveles tróficos, aspecto que se ha descuidado en la nutrición de organismos marinos (Estévez *et al.*, 1999), por lo que una mayor proporción de los $\omega-3$ en la cadena trófica es imprescindible en efectivos mecanismos formadores de membrana durante la metamorfosis de organismos marinos (Reitan *et al.*, 1994; Estévez and Kanazawa, 1995).

Es así que las proporciones de ácidos grasos $\omega-3:\omega-6$ por *Artemia franciscana* mostraron diferencias significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación (**aAARPt4**, **aAEPA4**, **aAEPA8** y **aAEPA16**) con respecto al control (**aAIPt4=ALGAL**) ($p<0,05$), excepto entre **aAIPt4=ALGAL** y **aAEPA4**, ver *tablas 8* y *figura 29a*. La proporción porcentual de los AG $\omega-3:\omega-6$ en *Artemias* estudiadas, se encontró entre 3,24:1% y 5,36:1% (*tabla 8*). Indicar que tal razón $\omega-3:\omega-6$ en *Artemia* fue entre 2 y 3

veces inferior, comparada con la proporción encontrada en el alimento (capítulo 7) con 4,28 (**aAIpt4=ALGAL**), 9,04 (**aAARPt4**), 9,27 (**aAEPA4**), 11,10 (**aAEPA8**) y 6,18;1% (**aAEPA16**), excepto con **aAIpt4=ALGAL** y **aAEPA16** donde tal relación fue relativamente muy cercana (*tabla 8*). Recaltar además que las condiciones de *Artemia* con zinc y cobre en el capítulo 3 de la presente disertación demostraron un mejor rendimiento con respecto al tratamiento **aAEPA16**. Se consiguió un índice de correlación $r^2=0,95$ (*figura 29b*) con ajuste a una tendencia lineal positiva en la condición **aAEPA** respecto a dicha razón, cuando se incremento la concentración de nutrientes (4, 8, y 16 mM).

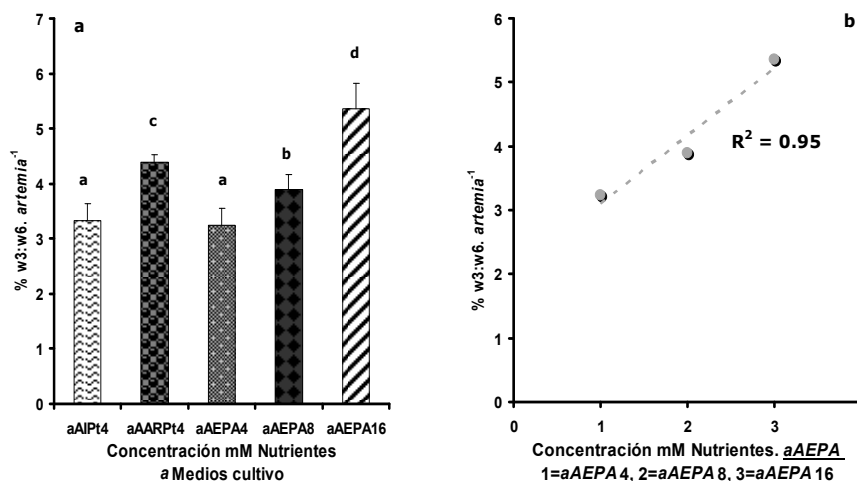


Figura 29. (a) Contenido porcentual de Ácidos grasos **w3:w6** en *Artemia franciscana* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficiente de correlación ácidos grasos **w3:w6**, medio de cultivo **aAEPA**4, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existen diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

Un aspecto importante desde el punto de vista fisiológico y nutricional en niveles superiores de la trama trófica alimenticia; es la proporción que existe del total de los ácidos grasos, el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3 EPA) y el ácido araquidónico (20:4n-6 ARA), tal proporción EPA:ARA es muy importante en la alimentación de las primeras etapas de desarrollo larval; ya que son componentes importantes de las bicapas de fosfolípidos de las membranas celulares. Excesos en la producción de eicosanoides derivados de ARA en el cerebro o en la pituitaria alteran el control neuroendocrino de los procesos implicados en el desarrollo de la pigmentación durante la metamorfosis de organismos marinos especialmente larvas de peces.

En los peces planos, la metamorfosis y el desarrollo de la pigmentación son controlados a nivel nervioso y neuroendocrinológico. En consecuencia, la producción anormal de eicosanoides en el cerebro como resultado de la alteración de los niveles de ARA y EPA trae consigo graves consecuencias para el desarrollo y la metamorfosis de las larvas de peces planos, incluyendo su anormal pigmentación, resultado de una composición sub óptima de los ácidos grasos del alimento vivo (Hamre *et al.*,2007; Hamre and Harboe, 2008); por lo que la proporción de EPA que promueve la formación de membranas a nivel celular sobre la proporción de ARA deberá ser siempre superior (Estévez *et al.*,1999).

Resultado de nuestras investigaciones en *Artemia franciscana* la cual fue alimentada con la microalga *Phaeodactylum tricornutum* cultivada y enriquecida con diferentes concentraciones de Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} y Se^{2-} , logrando así diversas formulaciones; es que logramos modificar la proporción EPA:ARA con los siguientes valores: 14,09:1% (**aAIPt4=ALGAL**), 19,23:1% (**aAARPt4**), 18,02:1% (**aAEPA4**), 21,90:1% (**aAEPA8**) y 25,27:1% (**aAEPA16**) como se puede observar en la *tabla 8* y *figura 30a*; existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto a el control ($p<0,05$, **aAIPt4=ALGAL**). Mostrar en la *figura 30b* que un incremento de la concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) en la condición de alimentación **aAEPA** produjo un aumento de tal razón EPA:ARA con un $r^2=0,99$ con ajuste a una tendencia lineal positiva. Sargent *et al.*,1999; Copeman *et al.*,1999; Estévez *et al.*,2001; Bell *et al.*,2003 sugieren que una normal supervivencia, crecimiento, pigmentación y metamorfosis se logra cuando el alimento vivo posee una relación EPA:ARA de 4,1-4,2:1 y también con una proporción de EPA: ARA tan alta como 20:1; sin embargo relaciones entre 1,5:1, 0,4:1 y 0,3:1 son insuficientes para el correcto desarrollo larval. Relaciones descritas en la presente disertación cubren eficientemente tales necesidades mediante *Artemia franciscana* modificada por la alimentación con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada y enriquecida con diferentes formulaciones. Resultando que la adecuada nutrición mineral vía la cadena trófica resulta una excelente herramienta biotecnológica en la modificación de la calidad del alimento vivo.

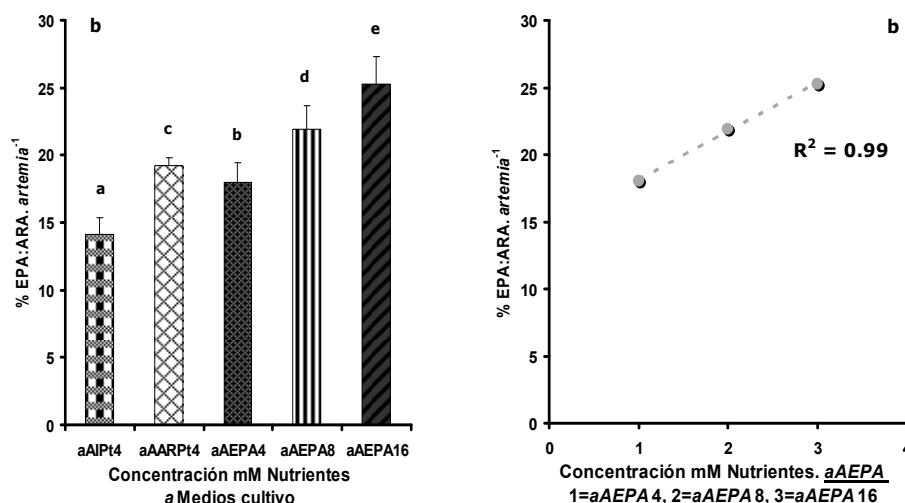


Figura 30. (a) Contenido porcentual de Ácidos grasos **EPA:ARA** en *Artemia franciscana* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficiente de correlación ácidos grasos **EPA:ARA** con el medio de cultivo **aAEPA4**, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existen diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

Actualmente, se esta prestando bastante atención a las investigaciones sobre la composición bioquímica y mineral de alimentos vivos, utilizados en la acuicultura, ya que el cultivo exitoso de peces y numerosos invertebrados acuáticos depende en parte de la correspondencia de la calidad nutricional de la dieta con las necesidades nutricionales de los organismos cultivados. Entre las diversas especies de zooplancton, el microcrustáceo *Artemia*

franciscana es necesariamente utilizado como el tercer eslabón alimenticio vivo en la cría de estadios tempranos de crustáceos y larvas de varios peces marinos y de agua dulce.

El conocimiento de las peculiaridades y los rangos de variación de la composición bioquímica de los organismos utilizados como alimento vivo vía la nutrición mineral es necesaria, a fin de elegir el método más apropiado para incrementar el valor nutritivo de los organismos cultivados. Una de las características bioquímicas más importantes a la que más atención se da en la elección de un alimento apropiado es la composición de ácidos grasos de los lípidos.

<p align="center">Tabla 1 Cultivo del Rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> alimentado con <i>Phaeodactylum tricornutum</i> con Algal de Alto Rendimiento (AAR) y Algal de Incremento de la Cantidad de EPA (AEPA) (cultivo semicontinuo) (modificado de Fábregas <i>et al.</i>, 1984). Concentración de nutrientes 4, 8, 16 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹</p>					
	rAIPt4	rAARpt4	rAEPA4	rAEPA8	rAEPA16
Densidad celular (10⁶ cél.mL⁻¹ std)	47,75 ±3,67	56,50 ±5,13	60,80 ±5,49	69,75 ±4,58	86,60 ±7,35
Productividad (10⁹ céls.L⁻¹.día⁻¹)	14,32 ±1,24	16,95 ±1,88	18,24 ±1,22	20,92 ±2,17	25,98 ±
F.O. celular					
%proteína en F.O.	38,58	25,98	27,60	26,53	39,14
% carboh. en F.O.	43,73	32,93	32,52	32,98	31,17
% lípidos en F.O.	17,69	41,09	39,87	40,49	29,69
F.O. Rotíferos					
%proteína en F.O.	44,58	41,21	41,93	42,41	41,02
% carboh. en F.O.	19,63	19,49	18,49	22,31	17,66
% lípidos en F.O.	35,79	39,30	39,57	35,29	41,31
Proteínas (pg.célula⁻¹ ± std)	5,08 ±0,18	6,08 ±0,34	5,89 ±0,22	9,50 ±0,25	10,65 ±0,35
Carbohidratos (pg.célula⁻¹ ± std)	2,32 ±0,48	7,71 ±0,41	6,94 ±0,59	8,59 ±0,28	8,49 ±0,55
Lípidos (pg.célula⁻¹ ± std)	5,76 ±0,21	9,62 ±0,42	8,51 ±0,86	8,20 ±0,75	8,08 ±0,69
Peso orgánico (pg.cel⁻¹)	13,16	23,41	21,34	26,29	27,22
Proteínas (ng.rot⁻¹ ±std)	130,1a ±10,92	136,3b ±12,54	135,6b ±12,13	160,1c ±15,36	190,4d ±17,38
Carbohidratos (ng.rotífero⁻¹ ±std)	57,31a ±3,93	64,48c ±1,45	59,78b ±4,51	84,20e ±2,72	82,00d ±6,09
Lípidos (ng.rotífero⁻¹ ±std)	104,5a ±11,69	130,01c ±7,94	127,95b ±5,03	133,21d ±12,10	191,77e ±16,31
Peso orgánico (ng.rotífero⁻¹)	291,94	330,82	323,30	377,48	464,19
Valor calórico (10⁻⁷ J.célula⁻¹)	3,90	6,58	5,96	6,98	7,19
Valor calórico (10⁻⁷ J.rotífero⁻¹)	82,36a	95,20b	93,41b	105,48c	135,65d
Peso seco (µg.mL⁻¹ ±std)	1282,4 ±8,01	1459,73 ±15,52	1372,93 ±33,80	1789,00 ±167,60	2133,87 ±44,40
Peso seco (pg.cel⁻¹ ±std)	15,68 ±1,19	27,96 ±2,34	26,06 ±1,83	32,79 ±1,16	33,80 ±2,55
Peso seco (ng.rotífero⁻¹ ±std)	299,4a ±11,25	340,0c ±31,81	332,5b ±8,95	390,6d ±15,25	482,3e ±12,56
Cenizas (pg.cel⁻¹ ±std)	2,52 ±0,15	4,55 ±0,28	4,72 ±0,30	6,50 ±0,34	6,58 ±0,19
Cenizas (ng.rotífero⁻¹ ±std)	7,47a ±0,20	9,20b ±0,50	9,18b ±0,96	13,10c ±1,92	18,15d ±2,64
Materia Orgánica (pg.cel⁻¹ ±std)	13,06 ±1,08	23,41 ±2,37	21,34 ±1,80	26,29 ±2,17	27,22 ±1,79
Materia Orgánica (ng.rotífero⁻¹ ±std)	291,9a ±18,56	330,8c ±28,35	323,3b ±11,20	377,5d ±14,17	464,3e ±16,30
DensidadT₈ (Rotíferos.mL⁻¹ ± std)	227,7a ±13,32	324,3b ±15,62	350,7c ±4,51	565,7e ±30,66	428,3d ±8,62
DensidadT₈ (huevos.mL⁻¹)	124,0a ±6,90	168,0b ±10,62	170,0c ±4,51	259,0e ±10,66	219,0d ±8,62
Q_N celular (pg)	12,28 ±0,72	12,76 ±0,90	12,92 ±0,78	16,11 ±0,52	29,14 ±0,94
Q_C celular (pg)	130,27 ±9,15	136,93 ±8,09	128,44 ±7,49	126,32 ±3,47	154,57 ±5,73
RelaciónC:N(átomos)	9,09	9,20	8,52	6,72	4,55
Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa (p<0,05).					

Tabla 2

Absorción atómica de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en concentraciones óptimas en *Brachionus plicatilis* alimentado con células de *Phaeodactylum tricornutum* (cultivo semicontinuo) cultivadas con Algal Alto Rendimiento (*AARPt*) (modificado de Fábregas et al., 1984) y Algal Industrial® (*AIPT*) (Fábregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹

Constituyentes <i>AIPT4</i>	Absorción Atómica (ng.rotífero ⁻¹)	Constituyentes <i>AARPt4</i>	Absorción Atómica (ng.rotífero ⁻¹)
S(0)mM	2,34a ±0,24	S(0,1)mM	3,29b ±0,14
Ca(0)mM	1,41a ±0,17	Ca(1,0)mM	2,30b ±0,11
Mg(0)mM	0,85a ±0,02	Mg(1,0)mM	1,18b ±0,13
Fe(20,0)mM	0,15a ±0,01	Fe(20,0)mM	0,16a ±0,01
Absorción Atómica (pg.rotífero ⁻¹)		Absorción Atómica (pg.rotífero ⁻¹)	
Zn(1,0)mM	140,0b ±10,0	Zn(0,1)mM	90,0a ±6,6
Si(0)mM	60,0a ±2,0	Si(1,0)mM	120,0b ±10,0
Se(0)mM	1,4a ±0,10	Se(1,0)mM	19,0b ±2,0
Cu (0,1)mM	6,4a ±0,4	Cu (0,1)mM	9,4b ±0,7

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=5). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

Tabla 3

Absorción atómica de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y S^{2-} en concentraciones óptimas en *Brachionus plicatilis* alimentado con células de *Phaeodactylum tricornutum* (cultivo semicontinuo) cultivadas con Algal Incremento Concentración EPA (AEPA) (modificado de Fábregas et al., 1984) y Algal Industrial® (AIPt4) (Fábregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4, 8, 16 mg át. N/L y tasa de renovación 30%. día⁻¹

Constituyentes AIPt4	Absorción Atómica (ng.rot ⁻¹)	Constituyentes AEPA4	Absorción Atómica (ng.rot ⁻¹)	Constituyentes AEPA8	Absorción Atómica (ng.rot ⁻¹)	Constituyentes AEPA16	Absorción Atómica (ng.rot ⁻¹)
S(0)mM	2,34a ±0,24	S(1,0)mM	3,76b ±0,20	S(1,0)mM	4,64c ±0,40	S(1,0)mM	5,42d ±0,31
Ca(0)mM	0,94a ±0,02	Ca(1,0)mM	1,99b ±0,14	Ca(1,0)mM	3,65c ±0,28	Ca(1,0)mM	3,97d ±0,18
Mg(0)mM	0,85a ±0,02	Mg(1,0)mM	1,16b ±0,16	Mg(1,0)mM	2,81c ±0,26	Mg(1,0)mM	3,64d ±0,22
Fe(20,0)mM	0,154a ±0,01	Fe(20,0)mM	0,174b ±0,010	Fe(20,0)mM	0,341c ±0,018	Fe(20,0)mM	0,447d ±0,020
Zn(1,0)mM	121,0b ±10,0	Zn(0,1)mM	72,0a ±7,0	Zn(0,1)mM	190,0c ±13,0	Zn(0,1)mM	231,0d ±19,0
Si(0)mM	61,0a ±3,0	Si(1,0)mM	114,0b ±10,0	Si(1,0)mM	158,0c ±14,0	Si(1,0)mM	185,0d ±16,0
Se(0)mM	1,4a ±0,11	Se(0,1)mM	11,0b ±1,0	Se(0,1)mM	17,1c ±1,1	Se(0,1)mM	22,0d ±2,0
Cu (0,1)mM	6,4a ±0,4	Cu (0,1)mM	6,6a ±0,5	Cu (0,1)mM	14,0b ±1,2	Cu (0,1)mM	18,0c ±1,01

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=5). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

Tabla 4. Composición de Ácidos Grasos en *Brachionus plicatilis* (% del total A.G.), ácidos grasos x rotífero (A.G. ng.rotífero⁻¹) y lípidos totales x rotífero (ng.rotífero⁻¹) alimentado con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con *Al*(Algal Industrial4), *AAR*(Algal Alto Rendimiento4), *AEPA*(Algal Incremento EPA4,8,16mM).

Acido Graso	(rAIPt4)			(rAEPA4)			(rAEPA8)			(rAEPA16)		
	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.
12:0	0.32±0.03	0.24±0.03	0.51±0.06	0.34±0.00	0.22±0.02	0.22±0.02	0.22±0.02	0.13±0.01	0.35±0.01	0.35±0.01	0.15±0.01	0.35±0.01
14:0	9.11±0.67	6.76±0.61	9.93±0.54	8.60±0.69	5.53±0.12	4.81±0.28	4.81±0.28	2.97±0.14	7.12±0.29	7.12±0.29	2.26±0.02	7.12±0.29
15:0	0.69±0.08	0.51±0.02	0.84±0.05	0.83±0.01	0.53±0.06	0.53±0.06	0.53±0.06	0.30±0.04	0.55±0.01	0.55±0.01	0.21±0.03	0.55±0.01
16:0	20.52±1.11	8.28±0.32	37.00±2.19	12.95±1.19	8.75±0.15	26.64±2.08	26.64±2.08	17.29±0.12	26.85±2.33	26.85±2.33	8.13±0.72	26.85±2.33
16:1(n-7)	48.98±1.55	41.25±4.74	28.97±1.23	22.36±1.31	38.09±2.23	34.76±1.77	34.76±1.77	19.78±2.04	30.26±2.70	30.26±2.70	9.57±0.64	30.26±2.70
16:2(n-6)	0.16±0.01	0.12±0.01	0.33±0.02	0.26±0.02	0.16±0.02	0.64±0.05	0.64±0.05	0.36±0.02	0.56±0.02	0.56±0.02	0.21±0.03	0.56±0.02
16:2(n-4)	0.32±0.02	0.24±0.02	0.80±0.01	0.57±0.03	0.35±0.01	0.68±0.02	0.68±0.02	0.37±0.03	1.07±0.12	1.07±0.12	0.42±0.01	1.07±0.12
16:3(n-3)	0.29±0.02	0.21±0.01	1.30±0.16	0.94±0.02	0.48±0.02	1.08±0.13	1.08±0.13	0.60±0.01	1.22±0.13	1.22±0.13	0.49±0.02	1.22±0.13
18:0	2.57±0.17	1.98±0.20	2.00±0.01	1.46±0.14	1.38±0.03	3.44±0.06	3.44±0.06	1.96±0.13	4.20±0.28	4.20±0.28	1.79±0.10	4.20±0.28
18:1(n-9)	3.77±0.67	2.80±0.16	2.51±0.15	1.71±0.15	2.64±0.01	4.44±0.27	4.44±0.27	2.52±0.24	3.06±0.19	3.06±0.19	1.16±0.10	3.06±0.19
18:1(n-7)	4.95±0.36	3.74±0.32	5.94±0.62	4.37±0.36	3.20±0.26	4.42±0.28	4.42±0.28	2.48±0.08	5.14±0.68	5.14±0.68	1.94±0.23	5.14±0.68
18:2(n-6)	0.61±0.01	0.45±0.03	0.83±0.01	0.60±0.04	0.67±0.03	1.78±0.09	1.78±0.09	1.01±0.11	1.75±0.16	1.75±0.16	0.67±0.02	1.75±0.16
18:3(n-6)	0.32±0.01	0.24±0.03	0.45±0.04	0.33±0.01	0.21±0.02	0.65±0.02	0.65±0.02	0.36±0.03	1.03±0.14	1.03±0.14	0.39±0.03	1.03±0.14
18:3(n-3)	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
18:4(n-3)	0.22±0.02	0.16±0.02	0.31±0.02	0.23±0.02	0.21±0.02	0.37±0.01	0.37±0.01	0.21±0.03	0.33±0.04	0.33±0.04	0.13±0.01	0.33±0.04
20:0	0.80±0.04	0.59±0.02	1.09±0.11	0.81±0.02	0.86±0.03	2.30±0.13	2.30±0.13	1.28±0.13	2.02±0.09	2.02±0.09	0.77±0.03	2.02±0.09
20:2(n-9)	0.06±0.00	0.04±0.01	0.09±0.00	0.07±0.00	0.03±0.00	0.15±0.01	0.15±0.01	0.09±0.01	0.15±0.02	0.15±0.02	0.07±0.00	0.15±0.02
20:3(n-5)	0.10±0.02	0.07±0.00	0.12±0.01	0.09±0.00	0.09±0.01	0.29±0.02	0.29±0.02	0.16±0.01	0.34±0.03	0.34±0.03	0.13±0.01	0.34±0.03
20:4(n-6)	0.35±0.02	0.26±0.03	0.29±0.03	0.15±0.03	0.17±0.03	0.35±0.12	0.35±0.12	0.20±0.01	0.27±0.14	0.27±0.14	0.28±0.04	0.27±0.14
20:4(n-3)	0.52±0.03	0.37±0.01	0.49±0.06	0.36±0.02	0.31±0.01	0.67±0.08	0.67±0.08	0.38±0.01	0.78±0.02	0.78±0.02	0.34±0.03	0.78±0.02
20:5(n-3)	4.01±0.57	2.97±0.14	5.43±0.21	4.19±0.13	3.09±0.19	7.69±0.59	7.69±0.59	4.35±0.17	8.65±0.15	8.65±0.15	3.06±0.02	8.65±0.15
22:0	0.11±0.03	0.08±0.00	0.03±0.00	0.02±0.00	0.06±0.00	0.30±0.03	0.30±0.03	0.17±0.02	0.24±0.01	0.24±0.01	0.08±0.00	0.24±0.01
22:1	0.10±0.02	0.07±0.00	0.06±0.01	0.04±0.00	0.04±0.00	0.17±0.01	0.17±0.01	0.10±0.01	0.22±0.02	0.22±0.02	0.08±0.00	0.22±0.02
22:3	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
22:5	0.59±0.04	0.44±0.03	0.72±0.03	0.53±0.04	0.40±0.03	1.49±0.00	1.49±0.00	0.85±0.01	1.57±0.17	1.57±0.17	0.57±0.01	1.57±0.17
22:6(n-3)	0.55±0.05	0.41±0.05	0.61±0.08	0.45±0.01	0.40±0.05	1.21±0.08	1.21±0.08	0.69±0.06	1.27±0.11	1.27±0.11	0.40±0.02	1.27±0.11
Saturados	33.80±1.7b	23.53±1.39	51.28±3.1d	39.57±2.29	17.62±1.19	38.03±2.3c	38.03±2.3c	22.05±2.02	39.08±1.9c	39.08±1.9c	12.41±0.23	39.08±1.9c
Monosaturados	57.79±1.9d	42.77±1.08	36.37±2.3a	28.06±1.14	43.84±3.24	43.78±2.9c	43.78±2.9c	24.88±2.21	39.13±1.6b	39.13±1.6b	12.75±0.57	39.13±1.6b
Poliinsaturados	8.09±0.2a	5.97±0.58	11.89±0.1c	8.67±0.76	5.90±0.37	17.97±1.4d	17.97±1.4d	10.14±0.30	21.49±1.5e	21.49±1.5e	7.65±0.18	21.49±1.5e
ω -3	5.03±0.28	3.70±0.31	7.45±0.13	5.44±0.63	4.08±0.55	9.82±0.37	9.82±0.37	5.54±0.12	11.18±1.18	11.18±1.18	4.12±0.11	11.18±1.18
ω -6	1.99±0.23	1.48±0.13	2.71±0.18	1.97±0.07	1.71±0.16	5.53±0.67	5.53±0.67	3.13±0.12	6.63±0.27	6.63±0.27	2.27±0.24	6.63±0.27
ω -3/ ω -6	2.52±0.2c	2.52±0.24	2.75±0.2d	2.75±0.22	2.35±0.14	1.77±0.0a	1.77±0.0a	1.77±0.03	1.68±0.1a	1.68±0.1a	1.68±0.18	1.68±0.1a
EPA	4.01±0.5a	2.97±0.14	5.43±0.2c	4.19±0.37	3.09±0.19	7.69±0.6d	7.69±0.6d	4.35±0.17	8.65±0.1e	8.65±0.1e	3.06±0.02	8.65±0.1e
DHA	0.55±0.0a	0.41±0.05	0.61±0.0b	0.45±0.01	0.40±0.05	1.21±0.0c	1.21±0.0c	0.69±0.06	1.27±0.1d	1.27±0.1d	0.40±0.02	1.27±0.1d
EPA/DHA	7.29±0.37	7.29±0.37	8.90±0.56	8.90±0.56	7.77±0.46	6.35±0.32	6.35±0.32	6.35±0.32	6.81±0.48	6.81±0.48	6.81±0.48	6.81±0.48
DHA/EPA	0.14±0.01	0.14±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01	0.13±0.02	0.16±0.01	0.16±0.01	0.16±0.01	0.15±0.02	0.15±0.02	0.15±0.02	0.15±0.02
EPA/ARA	11.46±1.0a	±	18.72±1.3b	±	21.30±1.8c	21.97±2.0c	21.97±2.0c	±	32.04±1.9d	32.04±1.9d	±	32.04±1.9d
Total A.G.	±	72.26±6.8d	±	76.54±7.2e	±	67.96±6.5c	67.96±6.5c	±	59.14±4.5b	59.14±4.5b	±	59.14±4.5b
Total Lípidos	±	104.48±11.69	±	130.01±7.94	±	127.95±5.03	127.95±5.03	±	133.21±12.10	133.21±12.10	±	133.21±12.10

A.G. ácido graso, EPA, eicosapentaenoico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0.05$).

<p align="center">Tabla 5 Cultivo de <i>Artemia franciscana</i> alimentada con <i>Phaeodactylum tricornutum</i> con Algal de Alto Rendimiento (AAR) y Algal de Incremento de la Cantidad de EPA (AEPA) (cultivo semicontinuo) (cultivo semicontinuo) (modificado de Fábregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4, 8, 16 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹</p>					
	aAIPt4	aAARPt4	aAEPA4	aAEPA8	aAEPA16
Densidad celular (10⁶ cél.mL⁻¹ std)	45,60 ±4,8	50,10 ±4,20	48,36 ±3,70	70,80 ±6,90	68,60 ±6,30
Productividad (10⁹céls.L⁻¹.día⁻¹)	13,68	15,03	14,51	21,24	20,58
F.O. celular					
% proteína en F.O.	38,58	28,81	31,73	39,48	48,99
% carboh. en F.O.	17,68	29,71	28,56	25,18	18,33
% lípidos en F.O.	43,74	41,48	39,70	35,34	32,67
F.O. Artemia					
% proteína en F.O.	68,03	55,83	70,49	71,01	58,65
% carboh. en F.O.	12,86	14,06	11,79	8,42	12,25
% lípidos en F.O.	19,11	30,10	17,70	20,57	29,10
Proteínas (pg.célula⁻¹ ± std)	5,08 ±0,10	8,04 ±0,40	7,94 ±0,80	10,41 ±0,37	15,94 ±0,13
Carbohidratos (pg.célula⁻¹ ± std)	2,33 ±0,17	8,28 ±0,33	7,15 ±0,15	6,64 ±0,44	5,96 ±0,22
Lípidos (pg.célula⁻¹ ± std)	5,76 ±0,56	11,58 ±1,07	9,93 ±0,21	9,31 ±0,35	10,62 ±1,31
Peso orgánico pg.cel⁻¹	13,17	27,91	25,01	26,36	32,52
Proteínas (µg.artemia⁻¹ ± std)	110,92a ±11,47	123,13b ±12,68	240,12e ±20,20	224,48d ±19,97	127,90c ±14,75
Carbohidratos (µg.artemia⁻¹ ± std)	20,96a ±2,07	31,02d ±2,05	40,18e ±3,00	26,61bc ±1,26	26,71c ±1,55
Lípidos (µg.artemia⁻¹ ± std)	31,16a ±1,48	66,40d ±3,17	60,31bc ±2,75	65,04d ±4,16	63,47cd ±3,86
Peso orgánico (µg.artemia⁻¹)	163,04	220,55	340,61	316,13	218,08
Valor calórico (10⁻⁷ J.célula⁻¹)	3,90	7,93	7,05	7,31	9,04
Valor calórico (10⁻⁶ J.artemia⁻¹)	4,25a	6,11b	8,63d	8,41c	6,03b
Peso seco µg.mL⁻¹ ±std	1382,40 ±8,01	1459,73 ±15,52	1372,93 ±13,38	1789,00 ±167,60	2133,87 ±44,40
Peso seco (pg.cel⁻¹ ±std)	15,62 ±1,19	33,26 ±2,34	29,77 ±2,07	31,93 ±2,16	38,40 ±2,65
Peso seco (µg.artemia⁻¹ ±std)	172,98a ±9,99	234,22b ±10,59	352,46d ±33,79	334,78c ±24,55	231,38b ±15,59
Cenizas (pg.cel⁻¹ ±std)	2,46 ±0,15	5,35 ±0,27	4,75 ±0,24	5,57 ±0,21	5,88 ±0,38
Cenizas (µg.artemia⁻¹ ±std)	9,94a ±12,75	13,67c ±1,86	19,95e ±1,39	18,65d ±1,06	13,30b ±1,50
Materia Orgánica (pg.cel⁻¹ ±std)	13,15 ±1,08	27,91 ±2,36	25,01 ±2,29	26,36 ±1,17	32,50 ±1,52
Materia Orgánica (µg.artemia⁻¹ ±std)	163,04a ±12,26	220,55c ±23,78	332,51e ±30,41	316,13d ±25,51	218,08b ±5,10
Supervivencia (%± std)	63,57a ±4,81	79,90b ±6,56	84,57c ±4,70	88,33d ±6,07	91,30e ±5,72
Longitud Total (mm.artemia⁻¹)	6,17a ±0,53	7,33b ±0,42	8,70c ±0,55	9,53d ±0,62	9,81e ±0,50
Q_N celular (pg)	12,28 ±0,72	12,76 ±0,80	12,92 ±0,78	16,11 ±0,52	29,17 ±0,94
Q_C celular (pg)	130,27 ±9,15	136,93 ±8,09	128,44 ±7,49	126,32 ±3,47	154,57 ±5,73
RelaciónC:N(átomos)	9,09	9,20	8,52	6,72	4,55
Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa (p<0,05).					

Tabla 6

Absorción atómica de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en concentraciones óptimas en *Artemia franciscana* alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* (cultivo semicontinuo) cultivadas con Algal Alto Rendimiento (*AARPt*) (modificado de Fábregas et al., 1984) y Algal Industrial® (*AIPT*) (Fábregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹

Constituyentes <i>aAIPT4</i>	Absorción Atómica ($\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$)	Constituyentes <i>aAARPt4</i>	Absorción Atómica ($\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$)
S(0)mM	1,42a ±0,15	S(0,1)mM	2,42b ±0,13
Ca(0)mM	0,58a ±0,01	Ca(1,0)mM	1,13b ±0,16
Mg(0)mM	0,40a ±0,02	Mg(1,0)mM	1,18b ±0,14
Zn(1,0)mM	0,30b ±0,01	Zn(0,1)mM	0,050b ±0,002
Absorción Atómica ($\text{ng}.\text{artemia}^{-1}$)		Absorción Atómica ($\text{ng}.\text{artemia}^{-1}$)	
Fe(20,0)mM	79,0a ±6,0	Fe(20,0)mM	160,0b ±13,0
Si(0)mM	29,0a ±3,0	Si(1,0)mM	104,0b ±9,0
Se(0)mM	1,2a ±0,11	Se(1,0)mM	13,0b ±1,0
Cu (0,1)mM	3,7a ±0,2	Cu (0,1)mM	9,2b ±0,4

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=5). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

Tabla 7

Absorción atómica de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y S^{2-} en concentraciones óptimas en *Artemia franciscana* alimentada con de *Phaeodactylum tricornutum* (cultivo semicontinuo) cultivadas con Algal Incremento Concentración EPA (AEPA) (modificado de Fábregas et al., 1984) y Algal Industrial® (AIPT4) (Fábregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4, 8, 16 mg át. N/L y tasa de renovación 30%. día⁻¹

Constituyentes <i>AIPT4</i>	Absorción Atómica ($\mu\text{g}.\text{art}^{-1}$)	Constituyentes <i>AEPA4</i>	Absorción Atómica ($\mu\text{g}.\text{art}^{-1}$)	Constituyentes <i>AEPA8</i>	Absorción Atómica ($\mu\text{g}.\text{art}^{-1}$)	Constituyentes <i>AEPA16</i>	Absorción Atómica ($\mu\text{g}.\text{art}^{-1}$)
S(0)mM	1,42a ±0,15	S(1,0)mM	2,36b ±0,20	S(1,0)mM	3,22d ±0,24	S(1,0)mM	2,75c ±0,23
Ca(0)mM	0,58a ±0,06	Ca(1,0)mM	1,30b ±0,15	Ca(1,0)mM	2,08c ±0,22	Ca(1,0)mM	2,77d ±0,19
Mg(0)mM	0,40a ±0,02	Mg(1,0)mM	1,46b ±0,13	Mg(1,0)mM	2,22c ±0,16	Mg(1,0)mM	2,44d ±0,12
Fe(20,0)mM	0,080a ±0,002	Fe(20,0)mM	0,124b ±0,016	Fe(20,0)mM	0,383c ±0,04	Fe(20,0)mM	0,594d ±0,025
Zn(1,0)mM	0,300b ±,02	Zn(0,1)mM	0,210a ±0,02	Zn(0,1)mM	0,640c ±0,05	Zn(0,1)mM	0,870d ±0,07
Si(0)mM	29,0a ±3,0	Si(1,0)mM	117,0b ±13,0	Si(1,0)mM	300,0c ±28,0	Si(1,0)mM	555,0d ±38,0
Se(0)mM	1,2a ±0,11	Se(0,1)mM	15,0b ±1,0	Se(0,1)mM	24,0c ±2,0	Se(0,1)mM	98,0d ±6,0
Cu (0,1)mM	3,7a ±0,23	Cu (0,1)mM	3,8a ±0,28	Cu (0,1)mM	15,0b ±1,0	Cu (0,1)mM	32,0c ±1,01

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=5). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

Tabla 8. Composición de Ácidos Grasos en *Artemia franciscana* (% del total A.G.), ácidos grasos x *Artemia* (A.G. $\mu\text{g. artemia}^{-1}$) y lípidos totales x *Artemia* ($\mu\text{g. artemia}^{-1}$) alimentada con *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con **Algal Industrial(AI4)**, **Algal Alto Rendimiento(AMP4)** **Algal Incremento EPA(AEPA4,8,16mM)**.

Ácido Graso	(aAIPT4)			(aAEPA4)			(aAEPA8)			(aAEPA16)		
	%A.G.	$\mu\text{g. artemia}^{-1}$	%A.G.	%A.G.	$\mu\text{g. artemia}^{-1}$	%A.G.	%A.G.	$\mu\text{g. artemia}^{-1}$	%A.G.	%A.G.	$\mu\text{g. artemia}^{-1}$	%A.G.
14:0	8.16±0.22	2.30±0.26	7.40±0.45	10.21±1.19	1.95±0.17	8.64±0.40	3.37±0.29	8.12±0.02	3.63±0.10			
15:0	0.52±0.01	0.14±0.02	0.29±0.03	0.10±0.01	0.10±0.01	0.42±0.03	0.16±0.02	0.47±0.02	0.21±0.02			
16:0	13.65±1.06	3.18±0.42	6.99±0.43	8.56±0.39	1.64±0.12	31.70±2.92	13.37±1.74	7.80±0.61	3.48±0.36			
16:1(n-7)	46.43±4.80	14.23±1.28	58.26±3.56	20.65±1.21	7.25±0.56	27.73±2.75	10.30±1.08	52.29±1.38	23.32±2.01			
16:2(n-6)	0.71±0.06	0.17±0.01	0.30±0.02	0.11±0.01	0.14±0.01	0.45±0.05	0.18±0.02	0.34±0.01	0.15±0.01			
16:2(n-4)	1.47±0.17	0.38±0.03	0.83±0.05	0.29±0.03	0.27±0.02	1.00±0.11	0.39±0.01	0.92±0.04	0.41±0.01			
16:3(n-3)	1.51±0.18	0.39±0.04	1.12±0.14	0.40±0.03	0.30±0.01	1.14±0.13	0.46±0.02	1.15±0.07	0.51±0.02			
18:0	3.45±0.28	1.01±0.14	3.98±0.27	1.41±0.13	1.37±0.09	8.34±0.91	3.33±0.45	8.22±0.19	3.67±0.31			
18:1(n-9)	10.91±1.15	2.86±0.32	8.62±0.73	3.06±0.25	2.51±0.25	10.39±0.64	4.04±0.10	10.30±0.50	4.60±0.34			
18:1(n-7)	4.36±0.55	1.20±0.19	3.86±0.37	1.37±0.11	1.18±0.14	3.94±0.36	1.53±0.14	3.64±0.06	1.62±0.12			
18:2(n-6)	1.14±0.09	0.28±0.01	0.71±0.38	0.25±0.02	0.24±0.03	0.60±0.06	0.23±0.01	0.52±0.01	0.23±0.02			
18:3(n-6)	0.16±0.01	0.04±0.00	0.14±0.02	0.05±0.00	0.04±0.00	0.09±0.02	0.04±0.00	0.10±0.01	0.04±0.00			
18:4(n-3)	0.13±0.01	0.03±0.00	0.12±0.01	0.04±0.00	0.02±0.00	0.05±0.00	0.02±0.00	0.07±0.02	0.03±0.01			
20:0	0.21±0.03	0.04±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00			
20:2(n-9)	0.10±0.01	0.02±0.00	0.03±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.04±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00			
20:3(n-5)	0.09±0.00	0.02±0.00	0.04±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00	0.04±0.00	0.02±0.00	0.04±0.00	0.02±0.00			
20:4(n-6)	0.45±0.03	0.11±0.01	0.34±0.05	0.13±0.02	0.14±0.02	0.29±0.03	0.11±0.01	0.22±0.01	0.14±0.01			
20:4(n-3)	0.04±0.00	0.01±0.00	0.03±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.04±0.00	0.01±0.00	0.04±0.00	0.02±0.00			
20:5(n-3)	6.34±0.21	1.68±0.12	6.54±0.39	2.32±0.21	1.88±0.13	6.35±0.33	1.57±0.18	5.56±0.61	2.49±0.33			
22:0	0.05±0.00	0.01±0.00	0.04±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.03±0.00	0.01±0.00	0.03±0.01	0.01±0.00			
22:3												
22:6(n-3)	0.13±0.01	0.03±0.00	0.05±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.05±0.00	0.02±0.00	0.04±0.00	0.02±0.00			
Saturados	26.05±1.7c	6.69±0.50	18.72±1.3a	6.63±0.59	5.08±0.49	49.15±2.4d	20.25±1.40	24.66±0.4b	11.01±0.46			
Monoinsaturados	61.70±1.7c	18.29±1.14	70.74±5.4e	25.07±1.98	11.24±1.10	42.06±2.7a	15.87±1.61	66.23±0.9d	29.54±0.34			
Poliinsaturados	12.25±1.1d	3.16±0.26	10.54±1.1c	3.74±0.19	2.69±0.17	8.78±0.6a	2.59±0.12	9.11±0.5b	4.07±0.33			
ω-3	8.15±0.24	2.14±0.22	7.86±0.37	2.78±0.24	1.83±0.17	5.58±0.73	2.02±0.11	6.86±0.56	3.06±0.32			
ω-6	2.45±0.09	0.60±0.03	1.79±0.19	0.63±0.33	0.56±0.04	1.43±0.14	0.56±0.02	1.28±0.10	0.57±0.01			
ω-3+ω-6	3.33±0.3a	3.33±0.31	4.39±0.1c	4.39±0.13	3.24±0.31	3.90±0.3b	3.90±0.27	5.36±0.4d	5.36±0.46			
EPA	6.34±0.2b	1.68±0.12	6.54±0.4c	2.32±0.27	1.88±0.13	6.35±0.3b	1.57±0.18	5.56±0.6a	2.49±0.33			
EPA:ARA	14.09±1.3a	±	19.23±0.6c	±	18.02±1.4b	±	21.90±1.8d	±	25.27±2.0e			
Total A.G.	±	28.13±2.1b	±	35.44±1.7c	±	19.11±1.1a	±	38.70±3.8d	±			
Total Lípidos	±	31.13±1.48	±	66.40±3.17	±	60.31±2.75	±	65.04±4.16	±			

A.G. ácido graso, EPA, eicosapentaenoico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0.05$).

Capítulo 9

Estudio poblacional, modificación bioquímica e incorporación de elementos por ***Artemia franciscana* y *Brachionus plicatilis***, ocasionada por el enriquecimiento con ***Isochrysis galbana* var. T-iso** cultivada en sistema semicontinuo, con una tasa de renovación del 30%, con los medios de cultivo ***AARTiso* y *ADHA***.

Diseño experimental

Se empleo un cultivo masivo del rotífero marino *Brachionus plicatilis* en Carboy's de 6 L, los cuales se filtraron y lavaron en periodos cortos con agua destilada para eliminar microbiota y posteriormente pasarlos a un nuevo carboy con agua de mar estéril. Tal proceso preventivo se realizó 24 h antes de iniciar los experimentos con la finalidad de estabulación alimentaria y sanidad de los rotíferos. Para realizar las experiencias de crecimiento poblacional, modificación bioquímica e incorporación de elementos. Los rotíferos a razón de 50 rotíferos.mL⁻¹ se transfirieron a botellas de borosilicato de 1 L con 700 mL de agua de mar autoclavada, sometidos a un flujo de aire de 20 burbujas.minuto⁻¹ aproximadamente, ciclos de luz:oscuridad 12h:12h, una intensidad luminosa de 52,3 $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y mantenidos en una cámara isotérmica con 22 \pm 2°C. A primera hora del ciclo de luz se alimentó al rotífero *Brachionus plicatilis*, a razón de 30,000 células.rotífero⁻¹ con biomasa de *Isochrysis galbana* var. T-iso (en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%) previamente cultivada con las formulaciones (capítulo 5) **AITiso4=Algal**, **AARTiso4**, **ADHA4**, **ADHA8** y **ADHA16**.

Diariamente a primera hora del ciclo de luz, se realizo el recuento de la densidad de rotíferos.mL⁻¹ así como del número de huevos por hembra, para posteriormente calcular la cantidad de biomasa celular para alimentar a razón de 30,000 células de *Isochrysis galbana* var. T-iso.rotífero⁻¹.

Los cultivos experimentales se mantuvieron durante 9 días tomando en cuenta que el ciclo de vida de *Brachionus plicatilis* dura aproximadamente 4 días (Ito 1955; 1957) por lo que los experimentos se finalizaron una vez transcurridas 2 generaciones. Al finalizar el periodo se contabilizo la densidad poblacional y numero de huevos producidos, se cosecharon por triplicado 70 mL de cultivo para determinación de peso seco, cenizas y materia orgánica, así como 50 mL ($n=3$) de biomasa, en filtros de malla nitex de 40 μm para determinación de proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, e incorporación de metales; estas muestras se ultracongelaron a -80°C para su posterior análisis.

Se incubaron y eclosionaron en agua salobre al 2,5%, filtrada (1 μm), quistes de *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) del Gran Lago Salado Utha (INVE, Aquaculture, Inc.), en un baño termostático a 28 \pm 1°C, una intensidad luminosa de 152,3 $\mu\text{mol quanta/m}^2/\text{s}^1$; por 24h y un flujo de aireación continua de 250 mL/min¹. Una vez eclosionados los nauplios se lavaron con agua destilada y formalina al 4% por 10 segundos, como tratamiento bacteriano preventivo; posteriormente se mantuvieron en agua marina estéril al 3,5%. Se espero a que los metanauplios cumplieran 48h después de la eclosión (DDE), tiempo en el cual han desarrollado un sistema digestivo eficaz-completo y pueden empezar a filtrar no selectivamente alimento (Sorgeloos *et al.*,2001). Para realizar las experiencias de crecimiento, supervivencia, modificación bioquímica e incorporación de elementos, los metanauplios_{48h} se transfirieron a razón de 2 metanauplios.mL⁻¹ en un volumen de 500mL en botellas de 1 L, sometidos a un flujo de aire de 20 burbujas.minuto⁻¹ aproximadamente,

ciclos de luz:oscuridad 12h:12h, se utilizó una intensidad luminosa de $52,3 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, las botellas de cultivo se mantuvieron en un baño termostático a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ dentro de una cámara isotérmica a $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

A primera hora del ciclo de luz se alimentó a *Artemia franciscana*, a razón de $300,000 \text{ células.artemia}^{-1}$ (Gelabert, 2003) con biomasa de *Isochrysis galbana* var. Tiso (en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%) previamente cultivada con las formulaciones **AITiso4=Algal, AARTiso4, ADHA4, ADHA8 y ADHA16**.

Diariamente se contabilizó la densidad de células.mL^{-1} del cultivo de *Artemia* para de esa forma corregir la ración diaria de microalgas de modo que entre el día 1 y 9 se utilizó una densidad celular de entre $300,000$ y $6,000,000 \text{ células.artemia}^{-1}$

Los cultivos experimentales se mantuvieron por 9 días, tiempo en el cual comenzó el cortejo de apareamiento, para cosechar la población al día 9. Se contabilizó la densidad poblacional, se cosecharon por triplicado 40 organismos para determinación de peso seco, cenizas y materia orgánica, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, e incorporación de metales; estas muestras se ultracongelaron a -80°C para su posterior análisis.

Resultados y discusión.

En situación similar a la que ocurrió en el capítulo 4 de la presente disertación se observó que en los días 2 y 3 de alimentación del rotífero *Brachionus plicatilis* con *Isochrysis galbana* var. T-iso, cultivada con diferentes formulaciones (**rAITiso4=ALGAL, rAARTiso4, rADHA4, rADHA8, rADHA16**), solo reveló un mínimo crecimiento poblacional (*figura 1*), situación que además se corroboró por la presencia de biomasa celular no filtrada por los rotíferos en cultivo. Este comportamiento pudo ser debido como lo menciona Ferreira, 2006 en sus estudios sobre bioencapsulación y crecimiento poblacional de la misma especie de rotífero, por manipulación, causante de estrés. Por lo que este lapso consideramos es un periodo de adaptación o fase "lag" como ocurre en copépodos los cuales después de un periodo de ayuno ("starvation") y entre su próxima alimentación dejan de producir individuos vivíparos, para producir solo huevos en las siguientes 9,5-65,5 horas (Ianora, 2005), periodo en el que es posible la eclosión de los huevos producidos por las hembras adultas así como muerte por adaptación de las mismas. Posterior a este proceso a partir del 4to día (*figura 1*) la densidad poblacional de rotíferos comenzó a multiplicarse adecuadamente. Al respecto Snell, 1986; Lubzens and Minkoff, 1988; Hagiwara and Hino, 1990, mencionan que motivo de estrés fisicoquímico las hembras producen huevos dormantes por lo general entre 1 y 8 los cuales tardarán en eclosionar según las condiciones del medio de cultivo; siendo significativamente más pequeños que los 18-23 huevos o más (Ruttner-Kolisko, 1974) producidos asexualmente durante sus 7 o 10 días de vida (Hoff and Snell, 1999).

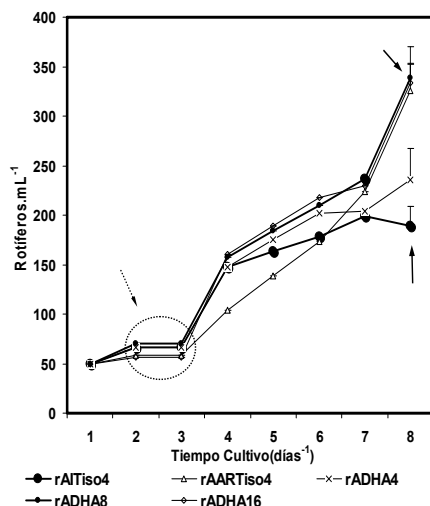


Figura 1. Evolución de la densidad de cultivo de *Brachionus plicatilis* (rotífero.mL⁻¹) alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada en semicontinuo, tasa de renovación 30% con diferentes medios de cultivo.

El empleo de las formulaciones **AITiso4=ALGAL**, **AARTiso4**, **ADHA4**, **ADHA8** y **ADHA16** en el cultivo de *Isochrysis galbana* var. T-iso produjo diferencias en la generación de densidad poblacional final de *Brachionus plicatilis*, la cual fluctuó de la siguiente manera: **rAITiso4=ALGAL** (189 rotíferos.mL⁻¹), **rAARTiso4** (326 rotíferos.mL⁻¹), **rADHA4** (236 rotíferos.mL⁻¹), **rADHA8** (338 rotíferos.mL⁻¹) y **rADHA16** (334 rotíferos.mL⁻¹) ver *tabla 1* y *figura 2*. Existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo mencionadas ($p<0,05$). Decir que en rotíferos alimentados con T-iso cultivada con el medio ALGAL, reconstituido parcialmente con diferentes elementos (capítulo 4), mostraron valores entre 255 y 325 rotíferos.mL⁻¹ donde solo el tratamiento cobre (303 rotíferos.mL⁻¹), silicio (314 rotíferos.mL⁻¹) y calcio (325 rotíferos.mL⁻¹) resultaron ser cercanos, a los obtenidos con las condiciones **rAARTiso4**, **rADHA8** y **rADHA16** (*tabla 1*). Hoff and Snell, 1999 mencionan que inoculando entre 36 y 66 rotíferos.mL⁻¹ llegan a obtener entre 5 y 8 días de cultivo densidades de solo 161 a 234 rotíferos.mL⁻¹ alimentando con una mezcla de microalgas y un Booster. Arnold and Holt, 1991 empleando el método de alimentación en base a microalgas, levadura y aceite emulsificado, logra cultivos masivos de rotíferos de solo 150-200 rotíferos.mL⁻¹. Ferreira 2006, alimentando rotíferos, empleando la misma microalga que el presente estudio cultivada con el medio ALGAL, con diferentes tasas de renovación e intensidad de luz moderada solo obtuvo entre 105 y 190 rotíferos.mL⁻¹. Whyte and Nagata, 1990; Fulks and Main, 1992; Snell, 1991; Tamaru *et al.*,1991; Nagata and Whyte, 1992, Vadstein *et al.*,1993; Hansen *et al.*,1997 concluyen que la tasa reproductiva es fuertemente afectada por el tipo y calidad del alimento proveído en su cultivo (Qi *et al.*,2009), así como el tamaño de partícula y las especies de microalgas determinaran la tasa reproductiva de *Brachionus plicatilis* (Sayegh *et al.*,2007; Hu and Xi, 2008; Alva-Martínez *et al.*,2009). Luna-Andrade *et al.*,2002 en su estudio combinado entre concentración de *Tetraselmis suecica* y cobre reporta valores de entre 36 y 251 rotíferos.mL⁻¹. Milione and Zeng 2007 evaluando el efecto de diferentes dietas microalgales sobre el crecimiento poblacional de *Acartia sinjiensis* obtienen altos rendimientos con *Isochrysis galbana* var. T-iso en comparación con *Nannocloropsis* sp, *Rhodomonas maculata* y *Tetraselmis chuii*. Hagiwara *et al.*,1997 mencionan que producciones de 150 rotíferos.mL⁻¹ son indicativo de baja obtención de huevos dormantes los cuales no contribuyen a incrementar la población de inmediato.

Schlosser and Anger, 1982; Lubzens, 1987; Miracle and Serra, 1989; Korstad *et al.*, 1989; Hirayama, 1990; Hiawa and Heerkloss, 1994, Patiño, 1995, mencionan que en *Brachionus plicatilis* existen diferentes factores como la temperatura, salinidad, aireación, tipo-tamaño-concentración y calidad del alimento, los cuales afectan la ingestión y multiplicación poblacional; en el presente estudio todos los anteriores parámetros fueron mantenidos constantes excepto la calidad del alimento microalgal vía su cultivo con diferentes formulaciones; por lo que las condiciones de cultivo de la microalga determinaron la supervivencia, tamaño, metamorfosis así como la tasa de reproducción de los organismos filtradores, alimentados con ellas. Es lógico pensar que esta calidad del alimento vía la complejidad mineral de las formulaciones con las que se le cultivo, fue la que produjo la oscilación de la ya citada generación poblacional.

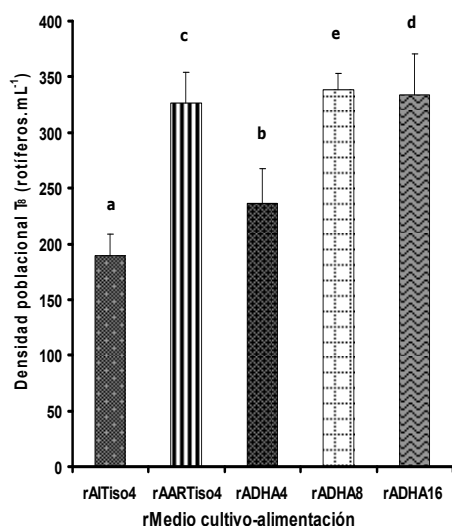


Figura 2. Densidad poblacional (T₈) de *Brachionus plicatilis* (rotífero.mL⁻¹) alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada en semicontinuo, tasa de renovación 30% con diferentes medios de cultivo.

Por otra parte, la producción final de huevos.mL⁻¹ fue la siguiente: **rAARTiso4** (115 huevos.mL⁻¹), **rADHA4** (76 huevos.mL⁻¹), **rADHA8** (102 huevos.mL⁻¹) y **rADHA16** (106 huevos.mL⁻¹) con respecto a el control (**rAIPT4=ALGAL**) con 11 huevos.mL⁻¹ (tabla 1), existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo mencionadas ($p<0,05$), ver tabla 1 y figura 3b; lo que correspondió a 0,42, 0,37, 0,39, 0,44 y 0,05 huevos.hembra⁻¹ respectivamente (figura 3a). Decir que en el capítulo 4 de la presente disertación rotíferos alimentados con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con el medio "ALGAL" reconstituido parcialmente por separado con diferentes concentraciones de Ca²⁺, Mg²⁺, Se²⁻, Si⁴⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, y S²⁻ mostró valores que oscilaron entre 0,20 y 0,54 huevos.hembra⁻¹ donde solo el cobre (0,54 huevos.hembra⁻¹), calcio (0,48 huevos.hembra⁻¹) y silicio (0,47 huevos.hembra⁻¹) mejoran la productividad encontrada con la condición **rADHA16** (0,44 huevos.hembra⁻¹). Ferreira 2006, alimentando rotíferos, empleando *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con ALGAL, con diferentes tasas de renovación e intensidad de luz moderada, solo obtuvo entre 0,25 y 0,33 huevos.hembra⁻¹. Milione and Zeng, 2007 indican que en el copépodo *Acartia sinjiensis* una dieta en base a *Isochrysis galbana* var. T-iso produce un mayor rendimiento en la producción de huevos. Kostopoulou and Vadstein, 2007 en estudios de crecimiento de variedades de *Brachionus plicatilis*, con

diferente concentración de *Nannochloropsis oculata*, en 3,5 días de experimentación obtienen producciones entre 0,84 y 0,96 huevos.hembra⁻¹. Støttrup and McEvoy, 2003 mencionan que la proporción de huevos depende de la calidad de los alimentos.

Cualquier desviación de las condiciones óptimas del alimento se refleja en bajas o altas tasas de producción de huevos en los cultivos de rotíferos. Por ejemplo, una proporción de huevos de menos de 0,13 para cultivos de *Brachionus plicatilis* indica inestabilidad y el colapso futuro posible del cultivo (Snell *et al.*,1987). La producción de huevos por hembra después de dos ciclos generacionales (T₈) se correspondió con la densidad poblacional de las formulaciones **AITiso4=ALGAL** y **AARTiso4**, en tanto que con la receta **ADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8, y 16mM) tal producción fue lineal con valores de 0,37, 0,39, 0,44 huevos.hembra⁻¹ (tabla 1); tales resultados pueden ser debidos a la viabilidad de eclosión de los huevos dada la calidad alimenticia de la haptofita vía la formulación de cultivo. *Isochrysis galbana* var. T-iso y su enriquecimiento con diferentes medios de cultivo, mostró influir de manera diferente y positiva en la generación de huevos por parte de las hembras amícticas. En la figura 3a se puede observar para la mayoría de las formulaciones, tres picos máximos de producción de huevos en los días 2, 4 y 7 de cultivo; resultados similares han sido descritos por Wullur *et al.*,2009 modificando la salinidad; datos que nos sugieren las siguientes generaciones poblacionales, las cuales incluso coinciden con lo mencionado por Ito 1955; 1957; Wullur *et al.*,2009 los cuales indican que el ciclo de vida generacional del rotífero es cercano a 4 días.

Nuestros resultados además de revelar que las diferentes formulaciones de cultivo para T-iso modificaron su calidad nutricional, también modificaron la tasa generacional en *Brachionus plicatilis*, una herramienta biotecnológica muy importante en la producción de alimento vivo para los siguientes niveles tróficos acuáticos. Motivo del ritmo circadiano 12L:12O al que fueron sometidos los cultivos de rotíferos, se pudo observar una gran uniformidad de tallas, así mismo un gran número de hembras a primera hora del ciclo de luz mostraban entre 3 y 5 huevos, al respecto Ruttner-Kolisko, 1972; Fulks and Main, 1992 mencionan que en condiciones óptimas de alimentación, una hembra puede albergar hasta 5 huevos al mismo tiempo; posterior a ese periodo fue solo ocasional encontrar hembras con huevos y la uniformidad de tallas se perdió. Al respecto Camus and Zeng, 2008 mencionan que con el copépodo *Acartia sinjiensis* la producción de huevos y eclosión de los mismos es debida al efecto del fotoperiodo al que se someten los cultivos masivos; tal y como ocurrió en el presente estudio con *Brachionus plicatilis*. El número de huevos predice el estado del cultivo para las próximas 24 h. En general la proporción de huevos dependió de la cantidad y calidad del alimento y es afectada por parámetros abióticos como los niveles de oxígeno, temperatura de cultivo, salinidad, pH, y niveles de amonio (Støttrup and McEvoy, 2003). Hoff and Snell, 1990 mencionan que las microalgas estimulan la maduración y producción de huevos comparado con una alimentación en base a levaduras.

La producción de huevos es uno de los principales factores que determinan el crecimiento poblacional en copépodos calanoides, y esto es debido a la calidad de la dieta (Uye, 1981; Castro-Longoria, 2003; Ianora, 2005) como fue evidente en el presente estudio con *Brachionus plicatilis* en particular en la proporción DHA/EPA de la dieta (Støttrup and Jensen, 1990; Kleppel *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006) de la cual hablaremos más adelante.

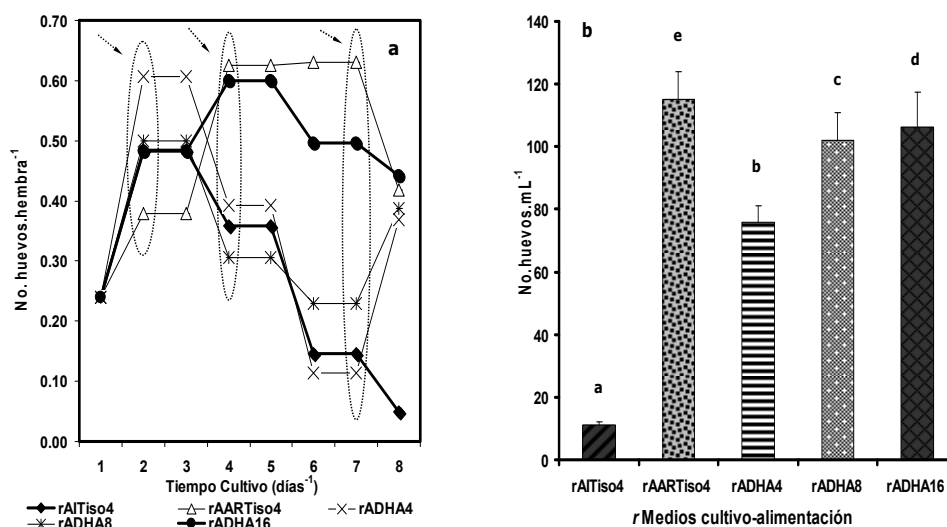


Figura 3. Evolución de la producción de huevos en *Brachionus plicatilis* (huevos.hembra⁻¹) **(a)** y número de huevos.mL⁻¹ producidos al T₈ **(b)** alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada en semicontinuo, tasa de renovación 30% con diferentes medios de cultivo. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

Se originaron las siguientes tasas de crecimiento poblacional (**r**) (algunas veces referida como **G**; Støttrup and McEvoy, 2003), para los rotíferos alimentados con *Isochrysis galbana* var. T-iso, cultivada con las diferentes formulaciones, donde **AARTiso4** (0,24 día⁻¹), **ADHA4** (0,19 día⁻¹), **ADHA8** (0,24 día⁻¹) y **ADHA16** (0,24 día⁻¹) mostraron un mejor rendimiento con respecto al medio **AITiso4=ALGAL** con 0,17 día⁻¹. Valores que estuvieron por encima de los obtenidos en rotíferos alimentados con la misma haptofita (capítulo 4), cultivada con el medio de cultivo "ALGAL" reconstituido parcialmente por separado con diferentes elementos y concentración de estos con 0,20-0,23 día⁻¹. Ferreira, 2006 cultivando al rotífero *Brachionus plicatilis* con la microalga *Isochrysis galbana* var. T-iso, cultivada con el medio ALGAL, con diferente tasa de renovación, solo obtiene tasas de crecimiento poblacional de entre 0,09 y 0,17. Algunos autores con otras especies de rotíferos han obtenido tasas de crecimiento más altas (0,42-0,81 día⁻¹) en cultivos con otras especies de microalgas (Scott and Baynes, 1978; Yúfera and Pascual, 1983; Carić *et al.*, 1993; Hagiwara *et al.*, 2007; Wullur *et al.*, 2009). Valores de **r** para varias cepas de *Brachionus plicatilis* usualmente se encuentran en el rango de 0,23-1,15, en tanto que para *Brachionus rotundiformis* es posible obtener valores entre 0,54 a 1,37, resultados que dependen del tipo de alimento como levadura húmeda o seca, microalgas secas, congeladas o vivas (Lubzens *et al.*, 2001), así como la especie de microalga con la que se les cultive, temperatura, además de la salinidad (Hirayama *et al.*, 1979; Lubzens *et al.*, 1989; 1995; Hagiwara *et al.*, 1995;

Hansen *et al.*, 1997). Hirayama and Satuito 1991 adicionando vitamina B₁₂ al medio de cultivo del rotífero obtiene un $r=0,39$. Por otra parte dada la oscilación que observaron nuestros resultados es evidente que los medios de cultivo ejercieron un diferente efecto sobre la calidad nutricional de *Isochrysis galbana* var. T-iso y que impacta en dicha tasa de crecimiento. La que a su vez está relacionada con la cantidad de alimento y dependiendo del tipo de dieta la cantidad requerida para alcanzar la multiplicación máxima (Yúfera *et al.*, 1983; Lubzens *et al.*, 1995; Ferreira 2006; Milione and Zeng, 2007). A medida que aumenta la tasa de reproducción de una manera curvilínea con la concentración de los alimentos, la comparación entre la eficacia de diferentes fuentes de alimento debe hacerse en el K_m o valores de saturación para cada tipo de alimento (Hansen *et al.*, 1997). La tasa de crecimiento poblacional (r) de rotíferos generalmente es más alta que en cladóceros y copépodos (Allan, 1976). En general r varía entre especies de rotíferos desde 0,2 a 2,0 por día, dependiendo de la especie y cantidad del alimento adicionado (Sarma *et al.*, 2001), Hu and Xi, 2008, obtienen valores de entre 0,04 y 0,11 con diferentes dietas microalgales en el rotífero de agua dulce *Brachionus angularis*.

En lo que respecta a la tasa de conversión alimenticia (TCA) y porcentaje de eficiencia de crecimiento (%EC), por el rotífero alimentado con la microalga, cultivada con los diferentes medios, se observó muy variable, mostrando los siguientes valores: **AARTiso4** (2,59-38,55%), **ADHA4** (2,21-45,26%), **ADHA8** (2,37-42,24%), **ADHA16** (3,11-32,11%) con respecto a el medio **AITiso4=ALGAL** con 1,83-54,36 respectivamente; demostrándonos en ambos casos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$). Indicar que rotíferos alimentados con T-iso cultivada con el medio de cultivo "ALGAL", reconstituido parcialmente con diferentes elementos (capítulo 4) revelaron un mejor rendimiento en la TCA en torno al 1,36-1,97, así mismo en el %EC en torno al 50-74%. Los valores de TCA nos muestran cuan eficiente es el rotífero para vía la microalga ganar peso de modo, que tales valores entre mas cercanos a 1 sean o inferiores a 1, mejor será la TCA. El %EC en la mayoría de los casos del presente estudio estuvo por debajo del 50%. El comportamiento de las anteriores variables nos da una idea de cuan importante suele ser la complejidad elemental de un medio de cultivo, la cual se ve reflejada en la calidad del alimento vía la cadena trófica.

Los diversos medios de cultivo en *Isochrysis galbana* var. T-iso produjeron diferentes efectos como alimento en la composición bioquímica de *Brachionus plicatilis* de la siguiente manera: la biomasa celular con **AITiso4=ALGAL** y **AARTiso4** manifestó la siguiente disposición bioquímica **Proteínas>Carbohidratos>Lípidos** (pg.cel⁻¹), en tanto que en los rotíferos una vez consumida la microalga la disposición fue **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos**(ng.rotífero⁻¹) en los dos casos (figura 4 a-b); en el caso de la biomasa con **ADHA4**, **ADHA8** y **ADHA16** reveló la siguiente composición proximal **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos**(pg.cel⁻¹), y una vez consumida la microalga por el rotífero **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos** (ng.rotífero⁻¹) en la totalidad de los casos (figura 5 a-b).

Las proteínas son las sustancias naturales más conservativas y no sufren de grandes cambios en el siguiente nivel trófico, las cuales además se caracterizan por una gran estabilidad en la composición de sus aminoácidos (Frolov *et al.*,1991). Mismo comportamiento conservativo de proporcionalidad de la dieta hacia el rotífero fue encontrado con los lípidos y carbohidratos con la condición de alimentación **ADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) (figura 5a-b), sin embargo con las condiciones **AITiso4=ALGAL** y **AARTiso4** a excepción de las proteínas, los lípidos y carbohidratos no fueron conservativos (figura 4a-b) tal y como lo menciona Frolov *et al.*,1991 en sus estudios con diferentes dietas microalgales donde no encuentra una clara relación entre la dieta y el rotífero. Esto no es sorprendente y podría ser explicado por un alto grado de integración entre estos componentes bioquímicos los cuales probablemente estén relacionados con la bioquímica de la reconstitución en el rotífero de sus tejidos.

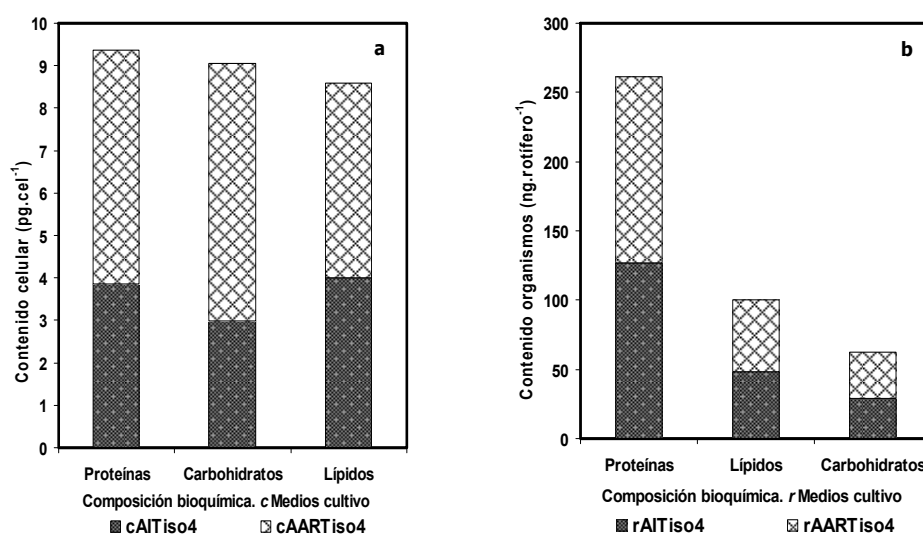


Figura 4.- Evolución de la composición bioquímica de *Isochrysis galbana* var. T-iso (a (pg.cel⁻¹) y de *Brachionus plicatilis* (b (ng.rotífero⁻¹) con respecto a los medios **AITiso4** y **AARTiso4**.

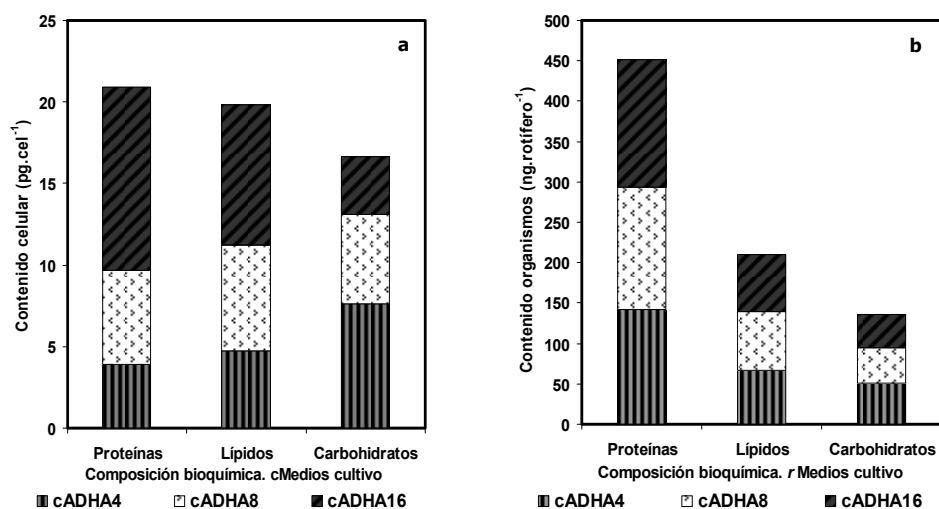


Figura 5.- Evolución de la composición bioquímica de *Isochrysis galbana* var. T-iso (a (pg.cel⁻¹) y de *Brachionus plicatilis* (b (ng.rotífero⁻¹) con respecto a los medios **ADHA4**, **ADHA8** y **ADHA16**.

Estudios similares han comparado la dieta y la composición del rotífero, conclusiones expresadas en términos de peso seco (Frolov *et al.*,1991; Fernández Reiriz *et al.*,1993; Reitan *et al.*,1997). Sin embargo los resultados de estos estudios son contradictorios; por ejemplo Frolov *et al.*,1991, obtiene una correlación positiva entre el contenido de proteína y lípidos del rotífero y su alimento, pero no existe correlación con los carbohidratos. Fernández Reiriz *et al.*,1993 encuentra una correlación rotífero-alimento en el contenido carbohidratos y lípidos pero no relación entre el contenido de proteínas. Al respecto Sayegh *et al.*,2007 mencionan que la composición del rotífero no es necesariamente el reflejo de la composición de la dieta.

En orden de importancia energética el contenido de proteína en el rotífero fue el mayor combustible bioquímico (*figura 4b y 5b*), una vez cultivado con la microalga con las diferentes formulaciones, de la siguiente forma: 127,07 ng.rotífero⁻¹(**rAITiso4=ALGAL**), 134,04 ng.rotífero⁻¹ (**rAARTiso4**), 142,59 ng.rotífero⁻¹ (**rADHA4**), 151,19 ng.rotífero⁻¹ (**rADHA8**) y 157,66 ng.rotífero⁻¹ (**rADHA16**) existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$); ver *tabla 1*. Mencionar que dichos valores de proteína fueron inferiores a los obtenidos en el capítulo 4 con rotíferos alimentados con la misma haptofita pero cultivada con el medio ALGAL reconstituido parcialmente con diferentes elementos en torno a 168,29 y 260,14 ng.rotífero⁻¹. Ferreira 2006, en su estudio sobre alimentación del rotífero *Brachionus plicatilis* con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con el medio ALGAL con distintas tasas de renovación logra contenidos de proteína inferiores al presente estudio en torno a 74 y 97ng.rotífero⁻¹. Por otra parte Sayegh *et al.*,2007 obtiene valores entre 80 y 175 ng.rotífero⁻¹ empleando en la alimentación del rotífero diferentes cepas de *Isochrysis galbana*.

En tanto que el segundo combustible lo representó el contenido de lípidos (*figura 4b y 5b*) con valores de: 49,12 ng.rotífero⁻¹ (**rAITiso4=ALGAL**), 52,16 ng.rotífero⁻¹ (**rAARTiso4**), 66,72 ng.rotífero⁻¹ (**rADHA4**), 72,50 ng.rotífero⁻¹ (**rADHA8**) y 70,27 ng.rotífero⁻¹ (**rADHA16**) (*tabla 1*), indicando diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$). Observar que dichos valores de lípidos (a excepción de la condición **rAITiso4=ALGAL**) fueron superiores a los obtenidos en el capítulo 4 con rotíferos alimentados con la misma haptofita pero cultivada con el medio ALGAL reconstituido parcialmente con diferentes elementos en torno a 47,44 y 63,06 ng.rotífero⁻¹. Ferreira 2006, en su estudio sobre alimentación del rotífero *Brachionus plicatilis* con *Isochrysis galbana* var. T-iso con distintas tasas de renovación logra contenidos de lípidos inferiores al presente estudio en torno a 36 y 56ng.rotífero⁻¹. Sayegh *et al.*,2007 reporta contenido de lípidos en rotíferos cultivados con diferentes cepas de *Isochrysis galbana* con una oscilación entre 45 y 85 ng.rotífero⁻¹.

Por lo que respecta a los carbohidratos (*figura 4b y 5b*) valores de 28,73, 33,62, 50,61, 44,12 y 41,14 ng.rotífero⁻¹ estuvieron presentes en **rAITiso4=ALGAL**, **rAARTiso4**, **rADHA4**, **rADHA8** y **rADHA16** comparativamente (*tabla 1*); indicando la existencia de

diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$). Dichos resultados son superiores comparándolos con los obtenidos en el capítulo 4 de la presente disertación en rotíferos alimentados con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con el medio de referencia "ALGAL", reconstituido parcialmente con diferentes elementos en torno a 31,98 y 41,40 ng.rotífero⁻¹. Ferreira 2006, en su estudio sobre alimentación del rotífero *Brachionus plicatilis* con la misma microalga, logra valores de carbohidratos inferiores a el presente estudio en torno a 19 y 33ng.rotífero⁻¹. En tanto Sayegh et al.,2007 reporta valores de 25 y 55ng.rotífero⁻¹.

Cuando el contenido de proteína se considera como porcentaje de la fracción orgánica, el valor de proteína según la formulación de cultivo probado, fluctuó mínimamente entre las condiciones **rAARTiso4** y **rAITiso4=ALGAL** con 60,98 y 62,01% respectivamente (figura 6 y tabla 1) en comparación con el incremento entre 54,86 a 58,60% cuando el rotífero fue alimentado con la condición **rADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8, y 16mM). Mencionar que dichos valores indicaron estar por debajo de los obtenidos en rotíferos alimentados con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con el medio de referencia "ALGAL", reconstituido parcialmente con diferentes elementos (capítulo 4) en torno a 65,87 y 72,03%. Sin embargo los juegos de resultados hallados en el presente estudio se consideran óptimos ya que Lubzens et al.,1989; Frolov et al.,1991; Tamaru et al.,1991; Frolov and Pankov, 1992; Nagata and Whyte, 1992; Fernández-Reiriz et al.,1993; Reitan et al.,1993; Rainuzzo et al.,1997; Øie and Olsen, 1997; Makridis and Olsen, 1999, Lubzens et al.,2001; Lubzens and Zmora, 2003 exponen un rango de contenido de proteína en el rotífero de entre el 28 y 63%. El contenido de proteína por rotífero puede incrementarse de un 60-80% cuando se aumenta la ración alimenticia. Ferreira, 2006 alimentando con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con el medio ALGAL y diferentes tasas de renovación solo obtiene valores entre un 52 y 57%.

Por lo que respecta a la fracción orgánica de los lípidos mostraron un rango de variación entre 23,73 y 27,07% (figura 6 y tabla 1), valores que estuvieron por encima de los obtenidos con rotíferos alimentados con T-iso cultivada con el medio ALGAL (capítulo 4), reconstituido parcialmente con diferentes elementos (16,84 y 20,27%). Por otra parte Ferreira, 2006 con la misma haptofita cultivada con el medio ALGAL y diferente tasa de renovación obtiene valores entre 26,26 y 30,52%. Teshima et al.,1987; Frolov et al.,1991; Nagata and White, 1992; Fernández-Reiriz et al.,1993; Rainuzzo et al.,1997; Lubzens et al.,2001; Lubzens and Zmora, 2003 mencionan que cerca del 34-43% de los lípidos en rotíferos son fosfolípidos y un 20-55% son triacilglicerol, con pequeñas concentraciones de monoacilglicerol, diacilglicerol, esterol, esterol esterol, y ácidos grasos libres. Los fosfolípidos y triacilglicerol muestran similares perfiles de ácidos grasos, pero estos son grandemente afectados por los lípidos proveídos en la alimentación del rotífero. El contenido lipídico de los rotíferos es generalmente un poco más bajo que el del alimento (tabla 1), lo que indicaría que los lípidos son utilizados por los rotíferos. Los rotíferos utilizan proporciones altas de DHA para la reproducción (Øie and Olsen, 1997) además de que la utilización de los lípidos depende de la temperatura (Olsen et al.,1993).

Finalmente los carbohidratos revelaron un comportamiento entre 15,29 y 19,47%, valores que estuvieron por encima de los obtenidos en el capítulo 4 de la presente disertación con 11,12 y 13,92%; al respecto Whyte and Nagata, 1990; Frolov *et al.*, 1991; Frolov and Pankov, 1992; Nagata and Whyte, 1992; Fernández-Reiríz *et al.*, 1993; Lubzens and Zmora, 2003; Ferreira, 2006 demostraron un rango entre 10,5 y 27%. De donde el 61-80% es glucosa (como glicógeno), un 9-18% de ribosa y 0,8-7,0% de galactosa, manosa, deoxiglucosa, fucosa, y xilosa (Nagata and Whyte, 1992). La fracción orgánica hace más evidente la compartimentalización de los combustibles bioquímicos en *Brachionus plicatilis* además de ser evidente que la calidad del alimento vía la diversidad de los medios de cultivo, promovió la calidad proximal del rotífero. Es sabido además que la ración alimenticia afecta la tasa reproductiva del rotífero y su contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos. Støttrup and Attramadal, 1992; Mourente *et al.*, 1995 demuestran que la calidad nutricional del rotífero depende directamente del alimento con que haya sido cultivado.

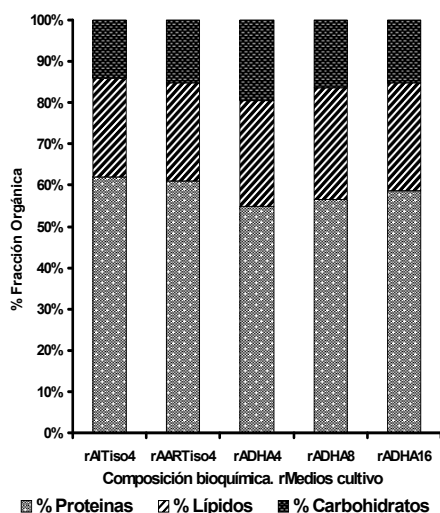


Figura 6.- Fracción orgánica de proteínas, lípidos y carbohidratos en *Brachionus plicatilis* alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes formulaciones

En lo que concierne al valor calórico (VC) por el rotífero, con base en la calidad nutricional de *Isochrysis galbana* var. T-iso, vía los diferentes medios de cultivo, se observaron los siguientes valores: $54,79 \times 10^7 \text{ J} \cdot \text{rotífero}^{-1}$ (**rAITiso4=ALGAL**), $58,50 \times 10^7 \text{ J} \cdot \text{rotífero}^{-1}$ (**rAARTiso4**), $69,20 \times 10^7 \text{ J} \cdot \text{rotífero}^{-1}$ (**rADHA4**), $72,46 \times 10^7 \text{ J} \cdot \text{rotífero}^{-1}$ (**rADHA8**), $72,62 \times 10^7 \text{ J} \cdot \text{rotífero}^{-1}$ (**rADHA16**) indicándonos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre los tratamientos y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre las condiciones **rADHA8** y **rADHA16** (tabla 1). Indicar que en el capítulo 4 de la presente disertación rotíferos alimentados con las condiciones silicio, zinc, y hierro mostraron un VC en torno a $65,70-66,65 \times 10^7 \text{ J} \cdot \text{rotífero}^{-1}$; valores que fueron inferiores a los obtenidos con **rADHA4**, **8** y **16**; en tanto condiciones como azufre ($93,23 \times 10^7 \text{ J} \cdot \text{rotífero}^{-1}$), cobre ($93,06 \times 10^7 \text{ J} \cdot \text{rotífero}^{-1}$) y selenio ($77,75 \times 10^7 \text{ J} \cdot \text{rotífero}^{-1}$) demostraron un mejor rendimiento con respecto a los valores del presente estudio.

Fernández-Reiríz *et al.*,1993; Lubzens and Zmora, 2003, mencionan que el valor calórico encontrado en los rotíferos dependerá de la dieta en un rango de $134 \times 10^7 \text{ J} \cdot \text{rotífero}^{-1}$ con levadura de cerveza y $200 \times 10^7 \text{ J} \cdot \text{rotífero}^{-1}$ después de 6 h de enriquecimiento con boostings. Revelando nuestros resultados que la calidad del alimento en el rotífero promovió diversos grados de calidad en el VC.

En lo que corresponde al peso seco (PS) por rotífero, en base a la microalga cultivada con las diferentes formulaciones, expresó los siguientes valores: 211,37 ng.rotífero⁻¹ (**rAITiso4=ALGAL**), 227,05 ng.rotífero⁻¹ (**rAARTiso4**), 269,38 ng.rotífero⁻¹ (**rADHA4**), 277,96 ng.rotífero⁻¹ (**rADHA8**) y 279,46 ng.rotífero⁻¹ (**rADHA16**) (figura 7a y tabla 1); indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control (**rAITiso4=ALGAL**) ($p<0,05$). Mencionar que en el capítulo 4 de la presente, rotíferos alimentados con los tratamientos silicio (261,58 ng.rotífero⁻¹), zinc (262,63 ng.rotífero⁻¹) y hierro (262,78 ng.rotífero⁻¹) estuvieron por debajo de **rADHA4, 8 y 16** (tabla 1), en tanto que azufre (374,05ng.rotífero⁻¹), cobre (372,05ng.rotífero⁻¹), selenio (308,18ng.rotífero⁻¹), calcio (289,75ng.rotífero⁻¹) y magnesio (294,12ng.rotífero⁻¹) mostraron superior rendimiento. Observar que la condición **rADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) la evolución del PS mostró un coeficiente de correlación r^2 de 0,86 (con ajuste a una tendencia lineal positiva) (figura 7b). Valores de peso seco que se correspondieron con la evolución de el peso orgánico (proteínas+lípidos+carbohidratos ng.rotífero⁻¹), 204,82, 219,82, 259,92, 267,81 y 269,07 ng.rotífero⁻¹ respectivamente; y por ende con el contenido de materia orgánica por rotífero (tabla 1). Lubzens *et al.*,1989 mencionan en sus investigaciones con *Brachionus plicatilis* que su valor nutricional dependerá de su peso seco, valor calórico y composición bioquímica; la cual es reflejo de la cantidad y calidad de su alimento.

Ferreira, 2006 en su estudio sobre alimentación con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con el medio algal y diferente tasa de renovación, consiguió entre 207,86 y 296,92 ng.rotífero⁻¹ de peso seco, resultados que son cercanos al presente estudio. Matsumoto *et al.*,2009 indican en su estudio que diferentes concentraciones de zinc enriqueciendo rotíferos, muestran inferir sobre el crecimiento del organismo ya que la longitud de la lorica varió entre los 229 y 247µm.

El peso seco de un rotífero es muy variable, en la literatura es frecuente hallar valores entre 300 y 600 ng, por lo que es evidente que en base a calidad del alimento vía la complejidad elemental de las formulaciones probadas en este estudio, es que se observó un efecto en la variación del peso seco por rotífero y no la ración diaria de *Isochrysis galbana* var. T-iso la cual siempre fue constante (30,000 cel.rotífero⁻¹) y que además satisficó las necesidades del rotífero. Theilacker and Kimball, 1984: Lubzens *et al.*,1989 indican que el peso seco del rotífero dependerá por sobre todo del tamaño y estado nutricional en el rango de 120-360 ng.rotífero⁻¹ excluyendo los huevos; sin embargo con abundante alimento de calidad en su periodo de vida, las hembras pueden llegar a pesar 620 ng.rotífero⁻¹. Yufera *et*

al.,1997 demuestran que el peso seco de *Brachionus plicatilis* se encuentra dependiendo de la calidad del alimento y tasa reproductiva entre 600 y 800 nanogramos por individuo. Moreno-Garrido *et al.*,1999 han informado que microalgas previamente enriquecidas por 1 o 2 días con cobre influyen sobre el incremento en biomasa del rotífero. Sayegh *et al.*,2007 alimentando rotíferos con 4 diferentes cepas de *Isochrysis galbana* obtiene pesos secos en torno a 300 y 400 ng.rotífero⁻¹ donde el mejor peso lo obtuvo con *Isochrysis galbana* var. T-iso.

En cuanto a el contenido de cenizas por rotífero como se puede observar en la *figura 7a* y *tabla 1* vario con respecto al medio de cultivo con el que fue cultivada *Isochrysis galbana* var. T-iso, donde el medio control mostró 6,45 ng.rotífero⁻¹ (*rAITiso4=ALGAL*), en tanto que los medios *rAARTiso4*, *rADHA4*, *rADHA8* y *rADHA16* mostraron 7,23, 9,46, 10,15 y 10,39 ng.rotífero⁻¹ respectivamente; indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control (*rAARTiso4*) ($p<0,05$) excepto entre las condiciones *rADHA8*, y *rADHA16*. Expresar que con respecto a la condición *ADHA* con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) la evolución de cenizas en el rotífero reveló un coeficiente de correlación r^2 de 0,93 (con ajuste a una tendencia lineal positiva) (*figura 7b*). Matsumoto *et al.*,2009 demuestran en sus estudios de incorporación de zinc en *Brachionus plicatilis* que el incremento en concentración del elemento se ve reflejado en el aumento de cenizas en torno al 2,19 y 2,47%.

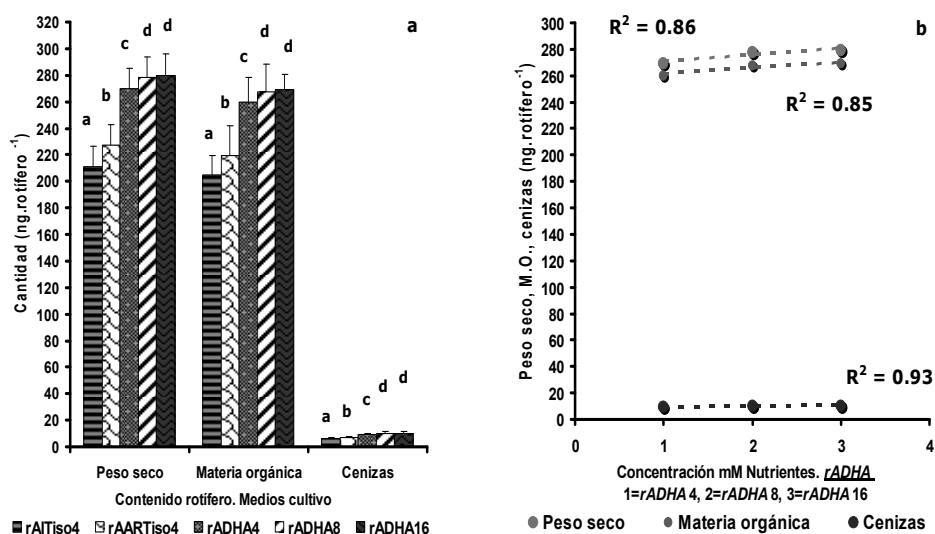


Figura 7.- (a) Contenido rotífero: peso seco, materia orgánica y cenizas (ng.rotífero⁻¹) alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo con diferentes medios de cultivo. **(b)** Correlación concentración nutrientes medio de cultivo *rADHA*. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

La incorporación de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} y Cu^{2+} por *Brachionus plicatilis* vía *Isochrysis galbana* var. T-iso, cultivada con las diferentes formulaciones, se puede observar en la *figura 8 a-b* y *figuras 9 a-b* y *tablas 2-3*; donde las cantidades de incorporación en el rotífero fueron muy variables dependiendo del medio de cultivo, lo que nos indicó la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones ($p<0,05$), *tablas 2-3*. Tales diferencias en tendencia concuerdan con los valores

de cenizas reportados en todas las condiciones de cultivo, que además son evidentes en el comportamiento del peso seco y orgánico del rotífero vía el alimento. Un incremento en la cantidad de los elementos-ingredientes de los medios de cultivo, se vio reflejado en la microalga (capítulo 6) y por ende en el siguiente nivel trófico (rotífero), provocando por tanto un descenso del peso orgánico acompañado de variaciones en el peso seco del rotífero (tabla 1).

El comportamiento de incorporación de los elementos en base a su concentración por organismo fue el siguiente: $S^{2-} > Ca^{2+} > Mg^{2+} > Fe^{3+} > Zn^{2+} > Si^{4+} > Se^{2-} > Cu^{2+}$ *rAITiso4*, en tanto que para *rAARTiso4* fue $Ca^{2+} > S^{2-} > Mg^{2+} > Zn^{2+} > Fe^{3+} > Si^{4+} > Se^{2-} > Cu^{2+}$, *rADHA4* $S^{2-} > Ca^{2+} > Mg^{2+} > Si^{4+} > Fe^{3+} > Zn^{2+} > Se^{2-} > Cu^{2+}$, y *rADHA8*, y *rADHA16* $S^{2-} > Ca^{2+} > Mg^{2+} > Si^{4+} > Zn^{2+} > Fe^{3+} > Se^{2-} > Cu^{2+}$. Demostrar que en el caso del medio de cultivo *ADHA* con diferente concentración de nutrientes (4, 8, 16mM) se obtuvieron coeficientes de correlación en la incorporación de S^{2-} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} Ca^{2+} de $r^2=0,99$, $0,86$, $0,96$ y $0,98$ respectivamente en todos los casos con ajuste a una tendencia lineal positiva (figura 10a). Por lo respecta al Zn^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} y Cu^{2+} mostraron una r^2 de $0,93$, $0,98$, $0,99$ y $0,97$ comparativamente con ajuste a una tendencia lineal positiva en todos los casos (figura 10b).

Los invertebrados acuáticos pueden acumular ciertos elementos lo cual dependerá de la biodisponibilidad vía su alimento (Wang and Fisher, 1999a) . Recientemente, estudios han demostrado que más del 50% de ciertos elementos en los organismos marinos se han obtenido exclusivamente a partir de la dieta (Wang and Fisher, 1998). Esto es especialmente cierto (>95%) para el selenio (Wang and Fisher 1998, 1999b). Recientemente más y más atención se ha dedicado al estudio de la acumulación de elementos por las microalgas y su posterior transferencia a copépodos marinos (Wang and Dei, 2001a; Wang et al.,2001). Estos estudios han indicado que el enriquecimiento de nutrientes puede provocar un aumento de la absorción de elementos por las microalgas y su posterior transferencia a copépodos (Wang et al.,2007).

Hamre et al.,2008 demostraron un aumento de la supervivencia de larvas de cod (bacalao) hasta un 32% durante el periodo de alimentación con rotíferos enriquecidos con yodo y selenio, además de que la concentración de micronutrientes en las larvas aumento en respuesta al enriquecimiento con selenio, pero no en respuesta al enriquecimiento con yodo.

Matsumoto et al.,2009 mencionan que un incremento de la concentración de zinc en el rotífero alimentado con *Chlorella*, obedeció al previo enriquecimiento de la microalga con este elemento en cortos periodos de tiempo. Comportamiento similar ocurrió en el presente estudio cuando se empleo la condición de cultivo del rotífero *rADHA* con diferente concentración de nutrientes (4, 8, 16mM), ajustándose dicha conducta a una tendencia lineal positiva ($r^2=0,86$).

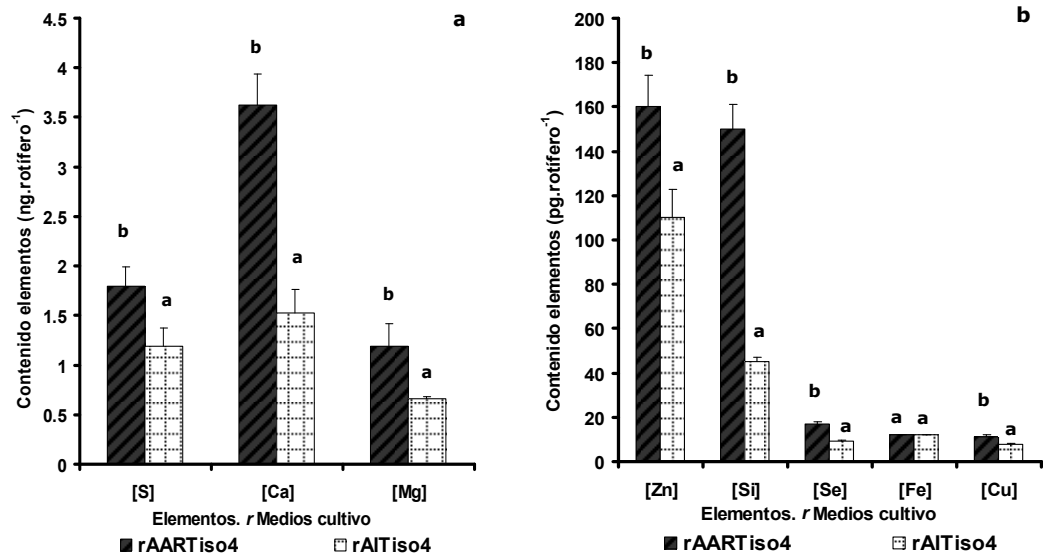


Figura 8.-Incorporación de elementos por *Brachionus plicatilis* alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con **rAARTiso4** y **rAITiso4**: **(a)** S²⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, **(b)** Zn²⁺, Si⁴⁺, Se²⁻, Fe³⁺, Cu²⁺. Media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa (p<0,05).

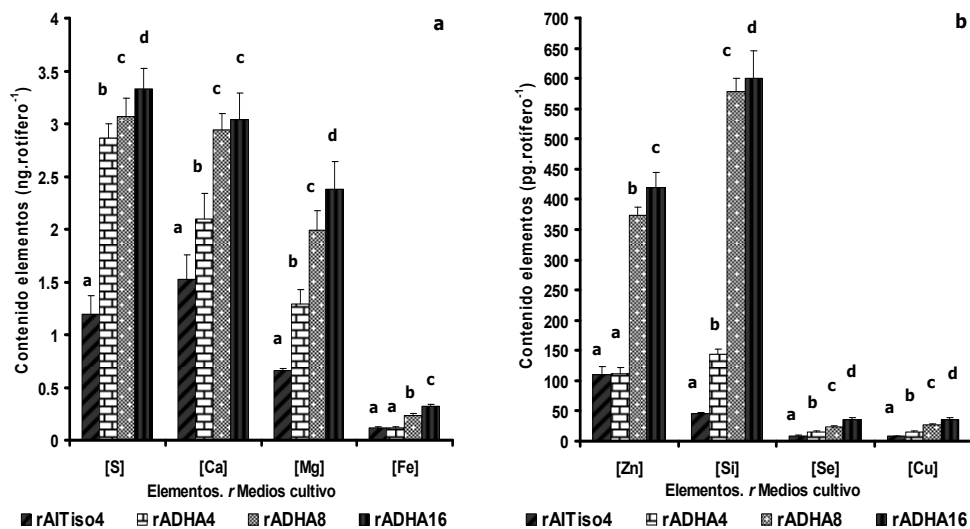


Figura 9.-Incorporación de elementos por *Brachionus plicatilis* alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con **AITISO4**, **ADHA4**, **8** y **16mM**: **(a)** S²⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺, **(b)** Zn²⁺, Si⁴⁺, Se²⁻, Cu²⁺. Media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa (p<0,05).

Existe poca información sobre la composición mineral de los rotíferos así mismo sobre el efecto de la dieta sobre esta, pero algunos resultados sugieren que alimentar rotíferos con *Nannochloropsis* sp incrementa ligeramente su contenido de sodio, potasio, zinc, cobre y manganeso (Watanabe *et al.*, 1983). Ferreira, 2006 enriqueciendo rotíferos en periodos de 8 días con *Nannochloropsis gaditana* e *Isochrysis galbana* var. T-iso indica, que dependiendo de la microalga empleada será el grado de acumulación de diferentes macro y microelementos, además de que el contenido de estos tiende a incrementarse en la medida en que se aumenta la tasa de renovación en cultivos en semicontinuo, asimismo demuestra que en

periodos de enriquecimiento por 24h con *Isochrysis galbana* var. T-iso es mayor el contenido de microelementos como el Mn, Cu, Cr, Co, Ni, Fe, Si, y de macroelementos como el Mg, K, Ca, S, P, y Zn; que en rotíferos cultivados con la misma microalga por 8 días. Normalmente poca atención se ha prestado a la nutrición mineral de organismos acuáticos, algunos autores no lo consideran un factor determinante del valor nutritivo de la dieta (Watanabe *et al.*, 1983). Sin embargo Robin, 1989 consiguió incrementar el crecimiento de larvas de rodaballo enriqueciendo rotíferos con una mezcla de minerales. La forma y concentración en la que se suministra un determinado elemento dada su importancia en procesos fisiológicos, metamórficos y de supervivencia es de crucial importancia en su bioacumulación a través de la cadena trófica. Ferreira, 2006 menciona en su disertación que es de relevante importancia tener en cuenta la biodisponibilidad de los elementos traza en el momento de formular los medios nutritivos ya que puede ser importante para mejorar la composición bioquímica de los organismos que forman parte de la cadena nutritiva en acuicultura, como resultado evidente en el presente estudio. El cultivo y crecimiento de rotíferos en circunstancias artificiales, como las encontradas en las hatcheries de peces marinos puede conducir a la falta de concentraciones adecuadas de diversos elementos importantes en el rotífero como alimento vivo debido a la limitación en la variedad de alimentos disponibles. Moreno-Garrido *et al.*, 1998, 1999 informan que las microalgas acumulan grandes cantidades de elementos como el cobre el cual no segregan al medio de cultivo hasta después de algún tiempo. Por lo que Matsumoto *et al.*, 2009 mencionan que la microalga *Chlorella* enriquecida con zinc puede ser utilizada como material para el enriquecimiento de rotíferos, tal y como fue evidente en el presente estudio.

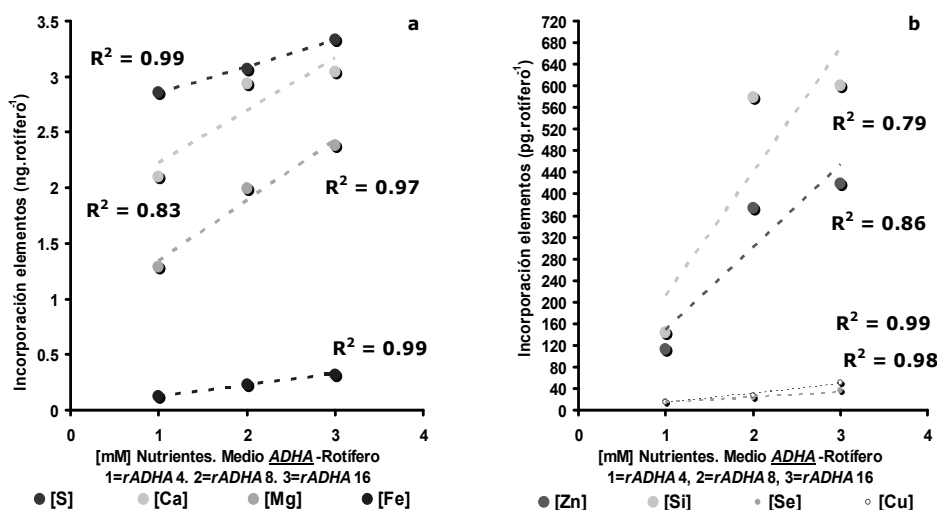


Figura 10.- Coeficientes de correlación en la incorporación de elementos por *Brachionus plicatilis* alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con el medio **ADHA4**, 8 y 16mM: **(a)** S²⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺, **(b)** Zn²⁺, Si⁴⁺, Se²⁻, Cu²⁺. Media ± SD (n=3).

El contenido de ácidos grasos en *Brachionus plicatilis* mostró la misma calidad que *Isochrysis galbana* var. T-iso (Ferreira 2006, Ferreira *et al.*, 2008), cultivada con **AITiso4=ALGAL**, **AARTiso4**, **ADHA4**, **ADHA8** y **ADHA16**; donde los ácidos grasos (AG) más abundantes entre un 10,82 y 22,09% están representados por el 14:0, 16:0 y el 18:1(n-9); valores ligeramente inferiores comparados con los reportados en rotíferos

alimentados con la misma haptofita (capítulo 4) cultivada con el medio de cultivo ALGAL reconstituido parcialmente con diferentes metales y metaloides con 13 y 26%, estimándose en conjunto en un 51,34-65,55% del total de los AG, contra los 46,85-57,93% del presente estudio. Observar además que la condición **rADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) mostró una correlación negativa en abundancia de un 57,93 a un 46,85%. Otros AG monoinsaturados y poliinsaturados de cadena corta entre un 1,71 y 9,38% son el 16:1(n-7), 18:0, 18:1(n-7), 18:2(n-6), 18:3(n-3) y 18:4(n-3), resultados muy cercanos en cantidad y calidad a los obtenidos en el capítulo 4 con 5 y 9%; en tanto ácidos grasos con más de 20 carbonos que representan un rango de 0,40-5,38% son el 20:1(n-9), 20:3(n-5), 20:4(n-6), 20:4(n-3), 20:5(n-3), 22:5(n-3) y 22:6(n-3), valores que se encuentran dentro los conseguidos en el capítulo 4 con 0,25-7,50%. Destacar que el ácido graso 22:5(n-3) en el rotífero alimentado con las condiciones **AARTiso4**(0,78%), **ADHA4**(0,58%), **ADHA8**(0,62%) y **ADHA16**(0,70%) mostró un mejor rendimiento con respecto a la condición control **AITiso4=ALGAL** (0,52%) (tabla 4). Así mismo con el ácido graso eicosapentaenoico 20:5(n-3) indico una presencia de **AARTiso4**(0,66%), **ADHA4**(0,40%), **ADHA8**(0,54%) y **ADHA16**(0,68%) mostrando un mejor rendimiento con respecto a la condición control **AITiso4=ALGAL** (0,47%); donde rotíferos alimentados con la condición **ADHA** en concentración de nutrientes 4, 8 y 16mM indican un índice de correlación $r^2=1$ (con ajuste a una tendencia lineal positiva) (figura 11b).

Las diferentes formulaciones (**AARTiso4**, **ADHA4**, **ADHA8** y **ADHA16**) en el rotífero vía *Isochrysis galbana* var. T-iso, demostraron diversos grados de evolución respecto a incrementar o decrecer porcentualmente tales AG. Siendo un hecho que en base a la concentración del ácido mirístico (14:0), palmítico (16:0) y palmitoleico (16:1(n-7)) es que fue posible la elongación y desaturación de la cadena de carbonos de los ácidos grasos vía dos sistemas enzimáticos como la *acetyl-coA* y *ácido graso sintetasa* (Huang *et al.*, 2010) bondad característica de los rotíferos los cuales pueden sintetizar otros ácidos grasos *de novo* de cadena más larga, importantes y de concentración apreciable en el rotífero (Lubzens *et al.*, 1985; Gurr *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2009), como lo fueron el 18:0, 18:1(n-9), 18:1(n-7), 18:2(n-6), 18:3(n-3), 18:4(n-3) y 20:1(n-9) que originaron series de otros AG poliinsaturados de cadena aun más larga como el 20:3(n-5), 20:4(n-6), 20:4(n-3), 20:5(n-3), 22:5(n-3) y 22:6(n-3) (tabla 4). Reitan *et al.*, 1993 demostraron una mejoría significativa en el crecimiento, supervivencia y viabilidad de larvas de rodaballo a la metamorfosis, por la adición de determinadas microalgas ricas en ácidos grasos altamente poliinsaturados (PUFAs) a rotíferos. Sugiriendo que las microalgas contribuyen a la mejoría de los lípidos, especialmente el EPA y DHA, y el contenido en proteínas de los rotíferos (Øie *et al.*, 1997) ya que los rotíferos por naturaleza son pobres en los requerimientos de PUFAs para estadios larvales tempranos (Bell *et al.*, 2003). En el presente estudio destaca por su concentración el ácido graso docosahexaenoico (DHA) el cual es importante en equilibrio con el EPA y ARA (ácido araquidónico) en procesos de metamorfosis pigmentación y supervivencia en etapas tempranas de desarrollo larval (Sargent *et al.*, 1995, 1997, 1999); el cual fue acumulado de la siguiente manera: 4,19% (**rAITiso4=ALGAL**), 5,38% (**rAARTiso4**), 4,04% (**rADHA4**), 5,25% (**rADHA8**) y 4,42% (**rADHA16**) indicándonos la existencia de

diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$), ver *tablas 4* y *figura 11a*. Indicar que los rotíferos alimentados con la condición **ADHA** con diferente concentración de nutrientes revelaron un coeficiente de correlación r^2 de 1 (con ajuste a una tendencia polinómica negativa) (*figura 11b*) respecto a la concentración de DHA. La presencia de dicho AG obedeció a la desaturación y elongación del AG 22:5n-3 (docosapentaenoico) el cual mostró una concentración en el rango de 0,52 al 0,78% (*tabla 4*). Los valores de DHA descritos en el presente estudio, se encuentran por debajo de los obtenidos por Ferreira 2006, quien obtuvo valores en torno al 8 y 11% en *Brachionus plicatilis* alimentados con la misma microalga que el presente estudio con diferentes tasas de renovación e intensidad lumínica moderada. Es evidente que la constitución del medio de cultivo de la microalga trae consigo una gran variabilidad de sus lípidos totales así como de los AG totales específicamente el DHA. Sin embargo Matsumoto *et al.*, 2009 demuestran que altas concentraciones de zinc vía la cadena trófica disminuyen la concentración de DHA en el rotífero en torno al 8 y 6 %.

Los ácidos grasos pueden proveer de información sobre el tipo y calidad de dieta ingerida (Dalsgaard *et al.*, 2003). Matsumoto *et al.*, 2009 mencionan que la inclusión de determinadas cantidades de zinc así como de otros elementos traza influyen sobre la riqueza de ácidos grasos de la microalga *Chlorella* que influye a su vez sobre la calidad del rotífero el cual además funciona como un vehículo para que el zinc cubra los requerimientos funcionales de larvas de peces marinos, así como supervivencia (Hamre *et al.*, 2008) con elementos como el yodo y selenio los cuales incrementan la concentración de los ácidos grasos en el rotífero. Johnston *et al.*, 2008 indican la importancia de la nutrición mineral de elementos como el calcio, cobalto, cobre, hierro, magnesio, manganeso, zinc, en todo el ciclo biológico de peces marinos y sobre la calidad de huevos vía la vitelogenina lo que produce huevos con mejores perfiles de PUFAs.

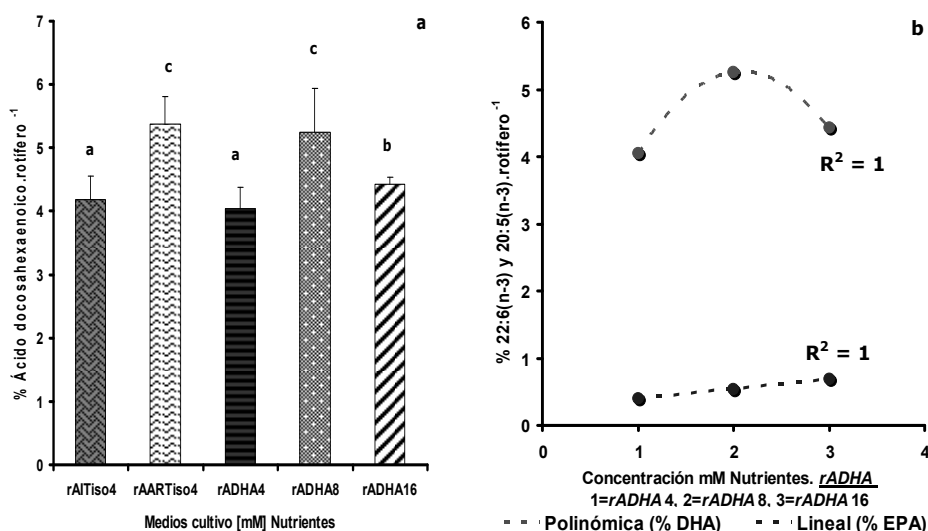


Figura 11. Contenido de **DHA.rotífero⁻¹** con diferentes medios de cultivo (**a**) y coeficientes de correlación **DHA** y **EPA** con **rADHA** 4, 8 y 16mM(**b**) en *Brachionus plicatilis* alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

El contenido de AGT (ng.rotífero^{-1}) que correspondió, del contenido lipídico de *Brachionus plicatilis* alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes formulaciones fue el siguiente: **rAITiso4=ALGAL**(25,04%), **rAARTiso4**(30,21%), **rADHA4**(29,51%), **rADHA8**(28,01%), **rADHA16**(28,80%); tales contenidos a excepción de de la condición control (**rAITiso4=ALGAL**) no se correspondieron con la dieta, ya que el contenido de AGT de la dieta (capítulo 6) estuvo por debajo con respecto al rotífero. Los presentes resultados fueron superados con respecto a los reportados en el capítulo 4 de la presente disertación en rotíferos cultivados con las condiciones Mg^{2+} (32,06%), Ca^{2+} (33,72%), Si^{4+} (36,66%) y Zn^{2+} (43,95%). Respecto a tales porcentajes autores como Teshima *et al.*,1987; Frolov *et al.*,1991; Nagata and White, 1992; Fernández-Reiriz *et al.*,1993; Rainuzzo *et al.*,1997; Lubzens *et al.*,2001, mencionan que cerca del 34-43% de los lípidos en rotíferos son fosfolípidos y un 20-55% son triacilglicerol, con pequeñas concentraciones de monoacilglicerol, diacilglicerol, esterol, ester de esterol, y ácidos grasos libres. Los fosfolípidos y triacilglicerol muestran similares perfiles de ácidos grasos, pero estos son grandemente afectados por los lípidos proveídos en la alimentación del rotífero (Rainuzzo *et al.*,1997). Es en base a nuestros resultados que observamos cuan importante y variable resultaron las diferentes formulaciones de cultivo en la modificación del perfil bioquímico en la cadena trófica.

Volkman *et al.*, 1989 y Devos *et al.*,2006 mencionan que tales porcentajes de AG respecto de los AGT son debidos a que *Isochrysis galbana* var. T-iso presenta una gran variedad de clases de lípidos (lípidos neutros, glucolípidos y fosfolípidos) por lo que una gran parte de estos son lípidos no formados por ácidos grasos (no acílicos), tales como esterol, hidrocarburo, alquenona o pigmento. Lípidos no formados por ácidos grasos que más contribuyen al contenido lipídico en esta haptofita son las alquenonas, metil y etilalquenonas, alquenoatos, y alquenos de cadena larga entre 36 y 39 carbonos, frecuentemente con dobles enlaces (Volkman *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1993; Versteegh *et al.*,2001; Eltgoth *et al.*,2005). Los perfiles de ácidos grasos de los lípidos tanto neutros y fracciones glucolípicas no son muy diferentes de la fracción lipídica total. Sin embargo, la fracción de fosfolípidos la mas importante muestra una muy diferente composición de ácidos grasos (Tocher *et al.*,2008). Devos *et al.*,2006 indican que una vez cuantificado la concentración de DHA en las diferentes clases de lípidos se pudo observar que los fosfolípidos representan un 75% del DHA total por célula. Dicha fracción relativamente baja de ácidos grasos, probablemente puede explicarse por altas fracciones de ácidos grasos inusuales, junto con un alto contenido de lípidos no formadores de ácidos grasos (Kayama *et al.*,1989). Es en base a nuestros resultados que observamos cuan importante y variable resulta ser la inclusión de diferentes elementos en la modificación del perfil bioquímico en la cadena trófica.

Se encontraron importantes diferencias en la evolución porcentual y ng.rotífero^{-1} de los ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGM) y poliinsaturados (AGP), existiendo en todos los casos diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo experimentadas ($p<0,05$) ver *tabla 4* y *figura 12a*. Revelar que en el

caso del cultivo *rADHA* con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) la evolución de dichos ácidos grasos expresó coeficientes de correlación $r^2=0,93$ (AGP), 0,51(AGS), 0,97(AGM), con ajuste a una tendencia lineal positiva en el 1er caso y negativa en el 2do y 3er caso (figura 12b).

Se observó un incremento de los AGS y AGM de la condición *rAARTiso4* con respecto a la condición *rAITiso4=ALGAL*; lo que correspondió con un incremento de los AGP del segundo caso sobre el primero; en tanto que con la condición *rADHA* con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) los AGS y AGM disminuyeron, para incrementarse los AGP, ver figuras 12a y tabla 4. Sin embargo solo las condiciones *rADHA8*(31,37%) y *rADHA16*(34,09%) mostraron un mayor rendimiento de los AGP sobre la condición control (*rAITiso4=ALGAL*) con 29,51%.

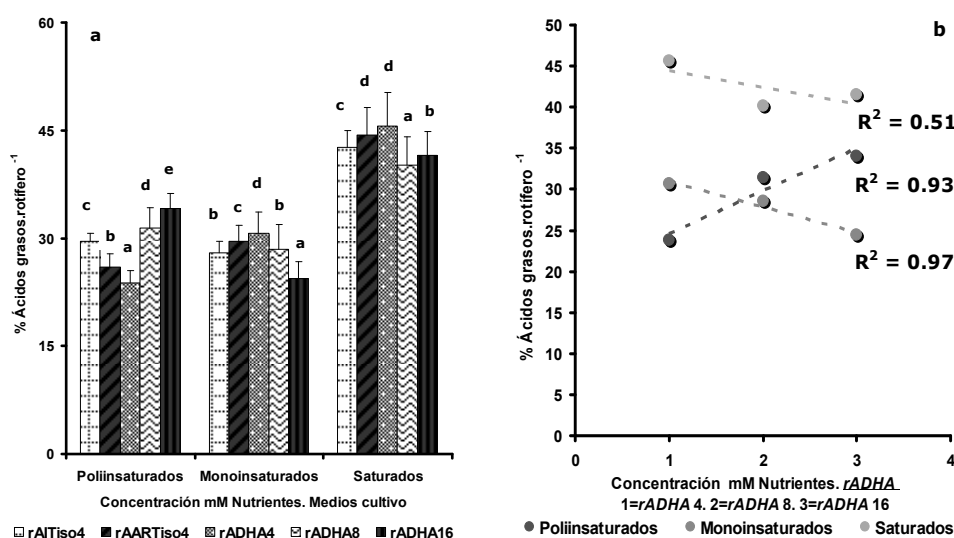


Figura 12. (a) Contenido porcentual de Ácidos grasos en *Brachionus plicatilis* alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficientes de correlación ácidos grasos, condición de cultivo *rADHA* 4, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

Los AGP se subdividen en tres familias, mediante las cuales se derivan los procesos de elongación y desaturación mediante las series $\omega-9$, $\omega-6$ y $\omega-3$; de los cuales las series importantes son la $\omega-3$ y $\omega-6$, así mismo la proporción entre estas dos series es de relevante importancia en el valor energético en cada uno de los niveles tróficos, aspecto que se ha descuidado en la nutrición de organismos marinos (Estévez *et al.*,1999), por lo que una mayor proporción de los $\omega-3$ en la cadena trófica es imprescindible en efectivos mecanismos formadores de membrana durante la metamorfosis de organismos marinos (Reitan *et al.*,1994; Estévez and Kanazawa, 1995).

Es con base en lo referido anteriormente, que una vez analizadas las razones de ácidos grasos ω -3: ω -6 por rotífero se observaron diferencias significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación (*rAITiso4=ALGAL*, *rAARTiso4*, *rADHA4*, *rADHA8* y *rADHA16*) ($p<0,05$), excepto entre *rAITiso4=ALGAL*, *rAARTiso4*, y *rADHA8* ver *tablas 4* y *figura 13a*. La proporción porcentual de los AG ω -3: ω -6 en los rotíferos estudiados se encontró entre 1,25:1% y 1,43:1% (*tabla 4*). Señalar que rotíferos alimentados con la misma haptofita que el presente estudio, cultivada con el medio ALGAL reconstituido parcialmente con calcio (1,87:1%), hierro (1,65:1%) y cobre (1,50:1%) (capítulo 4) revelaron mejor rendimiento comparado con la condición *rADHA16* (1,43:1%). Indicar que tal proporción ω -3: ω -6 en los rotíferos *rADHA8* y *rADHA16* estuvo por encima (26 y 45% respectivamente), con respecto a la hallada en la dieta (capítulo 6). Se consiguió un índice de correlación $r^2=0,93$ (*figura 13b*) con ajuste a una tendencia lineal positiva con el tratamiento *rADHA* respecto a dicha proporción, cuando se incremento la concentración de nutrientes (4, 8, y 16 mM).

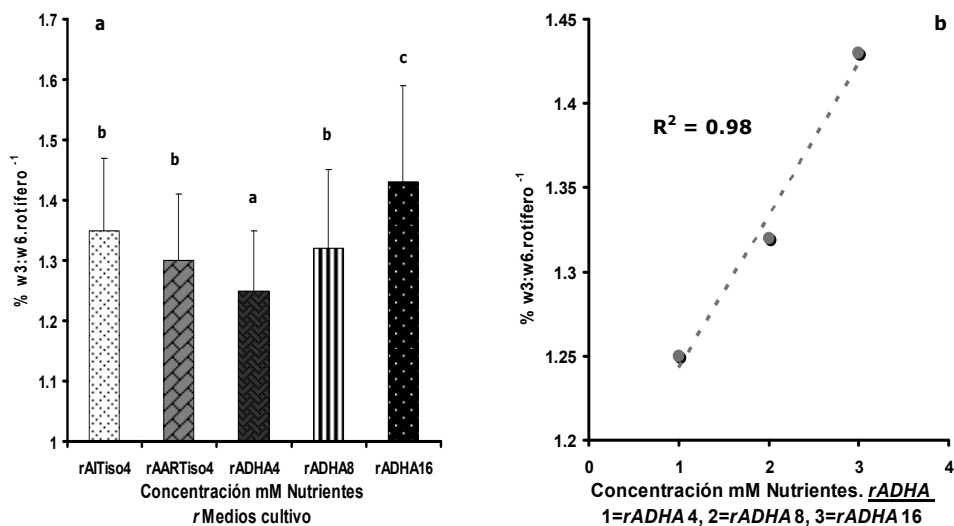


Figura 13. (a) Contenido porcentual de Ácidos grasos ω 3: ω 6 por rotífero alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficiente de correlación ácidos grasos ω 3: ω 6 cultivo *rADHA*4, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existen diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

Un aspecto importante desde el punto de vista nutricional en niveles superiores de la trama trófica alimenticia; es la proporción que existe del total de los ácidos grasos, el ácido docosahexaenoico (22:6n-3 DHA), eicosapentaenoico (20:5n-3 EPA) y el ácido araquidónico (20:4n-6 ARA), tal proporción DHA:EPA:ARA es muy importante en la alimentación de las primeras etapas de desarrollo larval, debido a que son los mayores fosfolípidos, componentes de membranas. Estos ácidos grasos son necesarios para un apropiado desarrollo neural de la retina y cerebro (Sargent *et al.*,1997, 1999b; Benítez-Santana *et al.*,2007) y jugar un papel esencial en la metamorfosis, pigmentación y resistencia al estrés en larvas de peces marinos (Kanazawa, 1997; Rainuzzo *et al.*,1997; Watanabe and Kiron,

1994; Weirich and Reigh, 2001; Bell *et al.*, 2003). Se ha sugerido una proporción óptima de DHA:EPA:ARA de 1,8:1,0:0,12 para larvas de rodaballo (Sargent *et al.*, 1999).

En los peces planos, la metamorfosis y el desarrollo de la pigmentación son controlados a nivel nervioso y neuroendocrinológico. En consecuencia, la producción anormal de eicosanoides en el cerebro como resultado de la alteración de los niveles de ARA y EPA trae consigo graves consecuencias para el desarrollo y la metamorfosis de las larvas de peces planos, incluyendo su anormal pigmentación; por lo que la proporción de DHA:EPA que promueve la formación de membranas a nivel celular sobre la proporción de ARA deberá ser siempre superior (Estévez *et al.*, 1999; Sargent *et al.*, 1999; Bell *et al.*, 2003).

Brachionus plicatilis alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso, modificada bioquímicamente mediante las diferentes formulaciones de cultivo, mostró la posibilidad de alterar en el rotífero la proporción **rDHA:ARA** de la siguiente manera: 0,84:1% (**rAITiso4=ALGAL**), 1,37:1% (**rAARTiso4**), 1,01:1% (**rADHA4**), 1,21:1% (**rADHA8**) y 1,35:1% (**rADHA16**) ver *tablas 4* y *figura 14a*; indicándonos la existencia de diferencias significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto a el control (**rAITiso4=ALGAL** $p<0,05$). Además fue posible observar que la condición **rADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) se ajustó a una tendencia lineal positiva en el incremento de la proporción **rDHA:ARA** con una $r^2=0,98$ (*figura 14b*). Tales resultados estuvieron por debajo de los descritos en el capítulo 4 de la presente disertación en rotíferos con los tratamientos cobre (1,53:1%), hierro (1,58:1%), silicio (1,47:1%) y zinc (1,42:1%).

Estévez *et al.*, 1999 encuentra una clara relación en la proporción DHA:ARA de los lípidos totales del cerebro de larvas de rodaballo sobre el porcentaje de pigmentación indicando que a mayores razones DHA:ARA mejor será la pigmentación a nivel larval. Cavalin and Weirich, 2009 lograron una mejor transformación y supervivencia larvaria con rotíferos alimentados con *Isochrysis* sp en una proporción DHA:ARA de 1,37:1%. Matsumoto *et al.*, 2009 en estudios de enriquecimiento en rotíferos con diferentes concentraciones de zinc vía *Chlorella* obtiene proporciones DHA:ARA entre 7,21 y 7,66:1%, en tanto que Hamre *et al.*, 2008 enriqueciendo rotíferos de manera directa con una mezcla de yodo y selenio obtiene valores de 11,66:1% los cuales mejoraron significativamente la supervivencia en la larvas de *Gadus morhua*, observándose además que existe un incremento de los micronutrientes de las larvas en respuesta al enriquecimiento con selenio vía *Brachionus plicatilis*. Relaciones descritas en la presente disertación cubren eficientemente tales necesidades, mediante los rotíferos modificados por la microalga cultivada con diferente complejidad elemental, resultando que la adecuada nutrición mineral vía la cadena trófica resulta una excelente herramienta biotecnológica en la modificación de la calidad del alimento vivo.

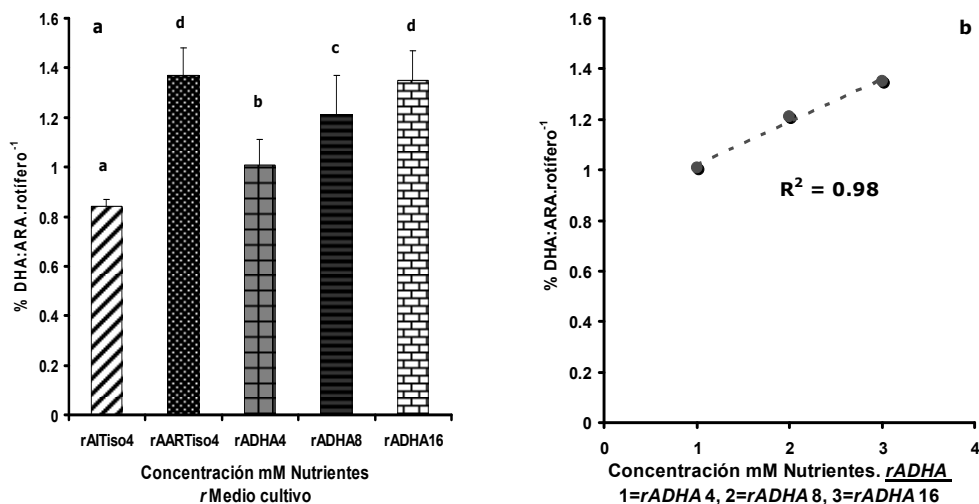


Figura 14. (a) Contenido porcentual de Ácidos grasos **DHA:ARA** por rotífero alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficiente de correlación ácidos grasos **rDHA:ARA** con el medio de cultivo **ADHA**4, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existen diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

Las diversas formulaciones de cultivo en *Isochrysis galbana* var. T-iso, de igual modo ejercieron un efecto en la relación DHA:EPA del rotífero la cual mostró los siguientes resultados: 7,17:1% (**rAITiso4=ALGAL**), 8,15:1% (**rAARTiso4**), 10,01:1% (**rADHA4**), 9,72:1% (**rADHA8**) y 6,51:1% (**rADHA16**) indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto al control (**rAITiso4=ALGAL** $p<0,05$) ver tablas 4 y figura 15a. Fue posible observar que la condición **rADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) se ajustó a una tendencia lineal negativa en la razón **rDHA:EPA** con una $r^2=0,81$ (figura 15b).

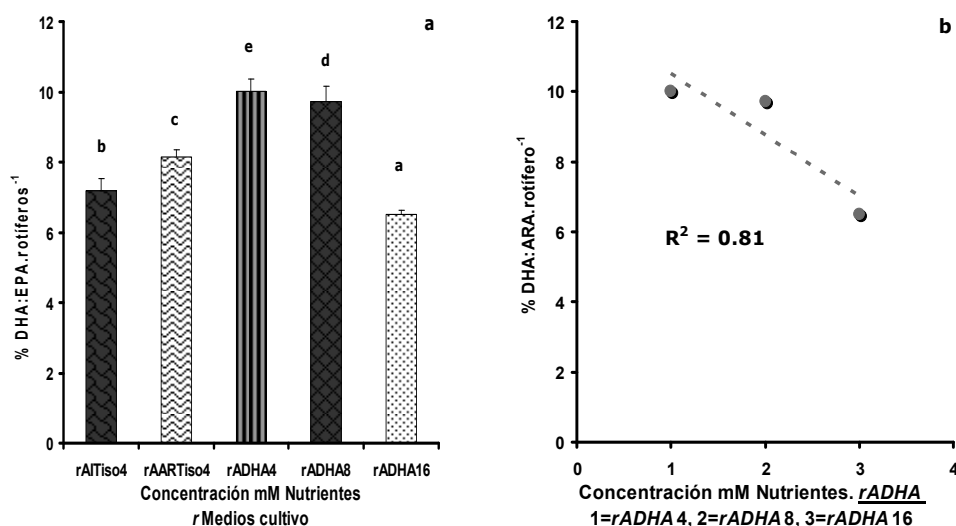


Figura 15. (a) Contenido porcentual de Ácidos grasos **DHA:EPA** por rotífero alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficiente de correlación ácidos grasos **rDHA:EPA** con el medio de cultivo **ADHA**4, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existen diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

Los peces marinos contienen grandes cantidades de ácido docosahexaenoico (22:6 n-3 DHA) eicosapentaenoico (20:5n-3 EPA) en los fosfolípidos de las membranas celulares. Los peces marinos no pueden biosintetizar DHA *de novo*, ni de los precursores de cadena más corta, como es el ácido alfa-linolénico (18:3 n-3). Es por ello que, DHA y EPA serán componentes esenciales de la dieta en los peces marinos. El DHA está presente en concentraciones muy elevadas en las membranas de células neuronales y visuales, particularmente en las membranas celulares externas así como membranas sinaptosomales, en peces como en mamíferos (Sargent *et al.*,1997, 1999; Koven *et al.*,2001; Anderson and De Silva, 2003). Por lo tanto, una insuficiencia de DHA en la dieta en etapas larvales tempranas de peces marinos es que puede perjudicar el desarrollo neurológico y visual con graves consecuencias para una serie de procesos fisiológicos y de comportamiento incluyendo los que dependen neuroendocrinológicamente.

Pigmentación anormal es común en los cultivos de larvas de peces planos marinos, y se puede mejorar sustancialmente rectificando el nivel de DHA en las larvas mediante el alimento vivo (Kanazawa *et al.*,1981; Kanazawa, 1993; Reitan *et al.*,1994b; McEvoy *et al.*, 1998b). Se ha considerado que la mal pigmentación puede ser consecuencia de un mal funcionamiento neuronal o visual, por ejemplo, de procesamiento anormal de las señales visuales, ya sea en el propio ojo, o posteriormente en el cerebro, desde la producción anormal de la hormona estimulante de melanocitos en el cerebro, de frente a perturbaciones en las conexiones sinápticas entre los nervios y el melanóforos en la piel. El síndrome de mal pigmentación es causado por una deficiencia de DHA o un exceso de EPA, por lo que diversos autores han documentado la importancia de una alta razón DHA:EPA (Kraul, 1993; Mourente *et al.*,1993; Reitan *et al.*,1994b; Lavens *et al.*,1995).

Destacar que la proporción **DHA:EPA** encontrada en los rotíferos con las diferentes formulaciones de cultivo de *Isochrysis galbana* var. T-iso supera lo reportado por Reitan *et al.*,1994b en Sargent *et al.*,1999 donde logra eliminar la mal pigmentación de larvas de rodaballo incluyendo aceite refinado de atún rico en DHA en proporción **DHA:EPA** $\geq 2:1\%$. Es de destacar que esta es esencialmente la misma proporción de DHA:EPA que existe en la yema de los muchos huevos y larvas de peces marinos (Tocher and Sargent, 1984). Rodríguez *et al.*,1997 observaron significativamente una alta tasa de crecimiento en larvas de sea bream alimentadas con rotíferos con relaciones DHA:EPA 1,5:1% con respecto a larvas alimentadas con razones 0,6:1%.

Sui *et al.*,2007 observo que en larvas de cangrejo chino *Eriocheir sinensis* proporciones dietarias DHA:EPA de 0,68:0,28 mostraban un inferior desarrollo larval y supervivencia con respecto a tratamientos con altas proporciones dietarias DHA:EPA de 2,85:1,17; lo que indica que altos niveles de ácidos grasos altamente poliinsaturados y en correcto balance DHA y EPA mejoran la respuesta larval al estrés. Por otra parte George *et al.*,2008 empleando a la microalga *Isochrysis galbana* var. T-iso como dieta en el cultivo de larvas del equinodermo *Dendraster excentricus* obtuvieron buen crecimiento, metamorfosis y desarrollo con razones DHA:EPA 7,43:1%. Ferreira 2006, alimentando rotíferos con

Isochrysis galbana var. T-iso con diferentes tasas de renovación solo obtuvo valores entre 2,09 y 4,93:1% valores 2 y 3 veces por debajo de los obtenidos en el presente estudio. Hamre *et al.*,2008 enriqueciendo rotíferos con una mezcla de yodo y selenio logra una proporción DHA:EPA de 1,7:1%. Roo *et al.*,2009 mencionan que enriqueciendo rotíferos con DHA de manera que este se encuentre entre el 1,8 y 4,7% del total AGT en el rotífero es posible inhibir la presencia de deformidades esqueléticas en *Pagrus pagrus*.

Artemia franciscana

El progreso de la tasa de alimentación de *Artemia franciscana* con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo con diferentes formulaciones (**aAITiso4=ALGAL**, **aAARTiso4**, **aADHA4**, **aADHA8** y **aADHA16**), desde metanauplio (1 Día Después de la Eclosión DDE) a preadulto (7 DDE), finalizando con el proceso de apareamiento (9 DDE) mostró un incremento en la ración alimenticia de $0,3 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ a $6,0 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ por organismo (*figura 16*) comportamiento similar fue descrito por Evjemo *et al.*,2000 evaluando la cinética de asimilación de *Isochrysis galbana* var. T-iso en diferentes estadios de crecimiento de *Artemia*; lo cual dependió de la transparencia del medio de cultivo, de esta manera todo el alimento adicionado diariamente fue ingerido por *Artemia* (Abreu-Grobois *et al.*,1991;Sorgeloos *et al.*,1994). Se observó en los días 2 y 3 de cultivo una lenta filtración de la ración alimenticia, corroborada en el conteo celular y transparencia en el medio de cultivo. Tal comportamiento pudo ser debido a manipulación, causante de estrés del organismo, un factor más la ración alimenticia, la cual pudo haber sido excedida en esos primeros días de cultivo (Evjemo *et al.*,2000); al respecto D'Agostino, 1980; Patiño, 1995 recomiendan una ración alimenticia inicial de 25 μg de microalgas (peso seco x metanauplio de *Artemia*), aunque en el presente estudio solo se administro en el inicio 3,89 μg (**aAITiso4=ALGAL**), 5,89 μg (**aAARTiso4**), 5,95 μg (**aADHA4**), 6,58 μg (**aADHA8**) y 8,70 μg (**aADHA16**) de microalgas por organismo debido al peso seco celular de *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes formulaciones (*tablas 5*), considerando lo descrito por Nimura 1963 el cual menciona que elevadas tasas de ingestión pueden retrasar el crecimiento de *Artemia*. Ulterior a este periodo (*figura 16*) la tasa de filtración de *Artemia franciscana* se incremento de forma casi lineal.

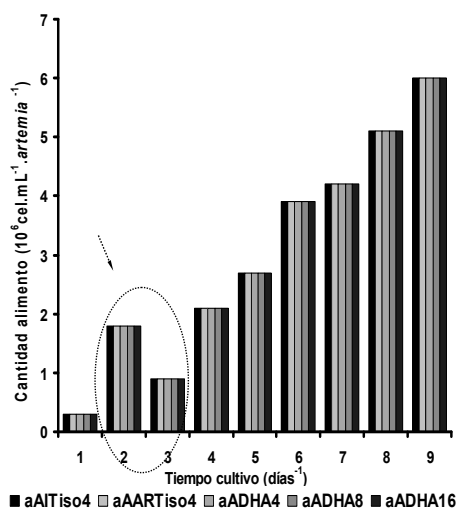


Figura 16.- Evolución del consumo (10^6 cel.mL^{-1}) de *Isochrysis galbana* var. T-iso (cultivada con diferentes formulaciones) por metanauplios, preadultos y adultos de *Artemia franciscana*

Tocante a la supervivencia de *Artemia* al T₉ alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada y enriquecida mediante diferentes medios de cultivo, reveló diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto al control (**aAITiso4=ALGAL** $p<0,05$) ver figura 17a y tabla 5; encontrándose valores de 67% (**aAITiso4=ALGAL**), 82% (**aAARTiso4**), 73% (**aADHA4**), 85% (**aADHA8**) y 84% (**aADHA16**). Observándose una correlación $r^2=0,71$ cuando *Artemia* fue alimentada con la condición **ADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16 mM) ver figura 17b. Indicar que tales valores de supervivencia fueron inferiores comparándoles con *Artemia* cultivada con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con el medio de cultivo "ALGAL" reconstituido parcialmente con azufre (88%), zinc (90%), cobre (93%) y hierro (91%) (capítulo 4).

Evjemo and Olsen 1999; Lora-Vilchis *et al.*, 2004 con *Isochrysis galbana* var. T-iso y la diatomea *Chaetoceros gracilis* obtiene una supervivencia entre el 86% y 93%. En tanto que Seixas *et al.*, 2009; Ronsón-Paulín *et al.*, 2009 con diferentes microalgas obtienen porcentajes en torno al 18 y 88%. Por otra parte Dhont and Van Stappen, 2003 indican en diversos sistemas de cultivo en los mismos tiempos que el presente estudio, supervivencias en torno al 45 y 82%. Por otra parte Anh *et al.*, 2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes al día 11 de cultivo mostró solo supervivencias entre 52 y 54%. La variabilidad en la supervivencia de *Artemia franciscana* dependió como se puede observar del enriquecimiento y calidad de la microalga con que fue alimentada, la cual además influyó en el tiempo en el cual *Artemia* llegó a su etapa adulta (7 DDE) y con ella al apareamiento (9 DDE) del 100% de los adultos, donde las hembras ya poseían desarrollado el ovisaco. Anh *et al.*, 2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes demostró al día 14 de cultivo una tasa de maduración entre el 95,2 y 99,7%.

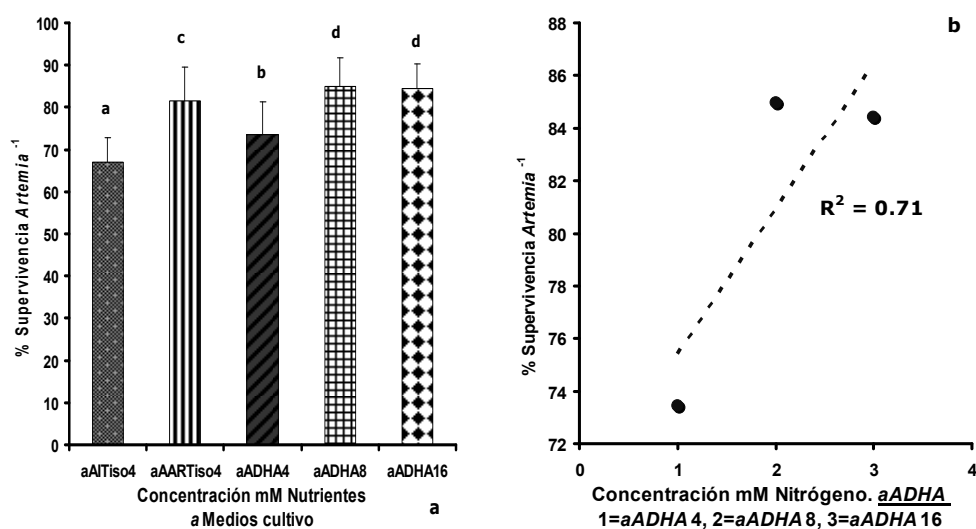


Figura 17.- Supervivencia de *Artemia franciscana* alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso (cultivada y enriquecida con diferentes medios de cultivo) **(a)** y coeficiente de correlación supervivencia con las condiciones **ADHA** 4, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$)

Los adultos de *Artemia franciscana* al T₉ de experimentación alcanzaron la siguiente longitud total (LT) por organismo: 5,44mm (**aAITiso4=ALGAL**), 7,71mm (**aAARTiso4**), 6,53mm (**aADHA4**), 8,64mm (**aADHA8**) y 8,67mm (**aADHA16**), indicando los resultados la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación y con respecto a el control ($p<0,05$) excepto entre las condiciones **aADHA8** y **aADHA16** ver *figura 18a*. Subrayar que se logro obtener un índice de correlación $r^2=0,76$ con una tendencia lineal positiva en la LT cuando *Artemia* fue alimentada con la condición de cultivo **ADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM), ver *figura 18b*. Mencionar además que los presentes resultados superan en rendimiento a los obtenidos en el capítulo 4; los cuales estuvieron en torno a 4,01 y 5,20 mm⁻¹ por adulto de *Artemia*.

Los resultados del presente estudio superan los 5,00 mm⁻¹ reportados por Evjemo and Olsen 1999, en 8 días de cultivo con *I. galbana* var. T-iso, Lora-Vilchis *et al.*,2004 alimentando *Artemia* por 7 días con *Isochrysis galbana* var. T-iso obtuvo tallas de solo 4,2 mm⁻¹. En tanto que Seixas *et al.*,2009 alimentando con *Rhodomonas lens*, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana* y *Nannocloropsis gaditana* al T₈ obtuvo LT en torno a 1,5 y 4,9 mm⁻¹. Por otra parte Anh *et al.*,2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes demostró valores superiores a las condiciones **aADHA8** (8,64mm) y **aADHA16** (8,67mm) pero al día 14 de cultivo, demostrando LT en el rango de 8,8 y 9,4mm, en tanto que Ronsón-Paulín *et al.*,2009 al día 14 de cultivo con *Tetraselmis suecica*, *Nannocloropsis* sp y mezcla de estas con y sin probióticos obtiene tallas entre 5,2 y 7,65 mm por individuo.

Sin embargo Dhont and Van Stappen, 2003 citan que después de 2 semanas de cultivo con diferentes dietas vivas o inertes es posible que los preadultos o adultos de *Artemia* en promedio posean una longitud de 5 mm. Fábregas *et al.*,1996, 1998; Evjemo and Olsen, 1999, señalan que diferentes concentraciones de alimento influyen sobre el crecimiento y la reproducción de *Artemia franciscana*; en el presente estudio para todas las condiciones probados, las tasas de alimentación fueron las mismas (300,000 cel.organismo⁻¹ Nimura, 1980), alterando solo la calidad de la dieta vía la complejidad mineral de las formulaciones probadas, lo que nos demostró que la variabilidad de tallas es reflejo de la diversidad en la nutrición mineral.

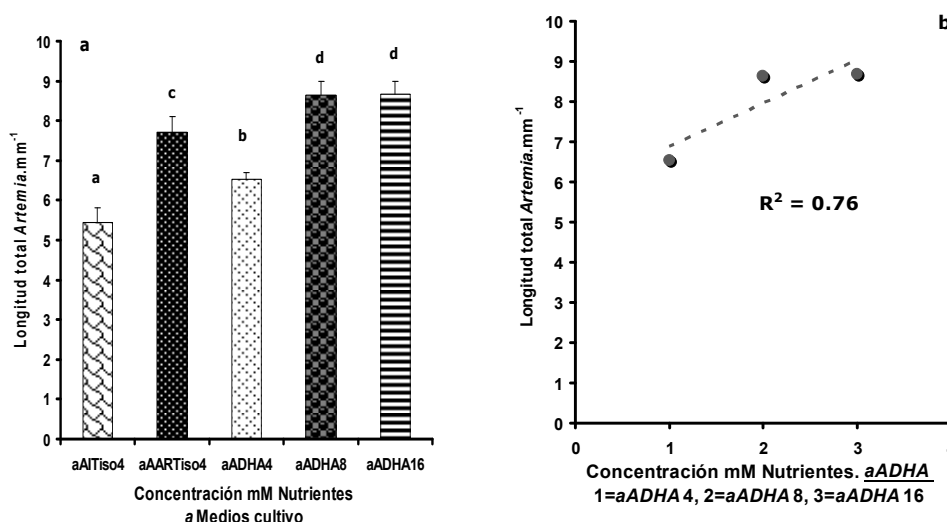


Figura 18.- Longitud total (LT) de *Artemia franciscana* alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso (cultivada y enriquecida con diferentes medios de cultivo) **(a)** y coeficiente de correlación LT con las condiciones **ADHA** 4, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$)

En lo que se refiere a la tasa de conversión alimenticia (TCA) y porcentaje de eficiencia de crecimiento (%EC), por *Artemia* al tiempo T_9 , alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada y enriquecida con las diferentes formulaciones, fue muy versátil, revelando los siguientes valores : **aAITiso4=ALGAL**(2,17-46,15%), **aAARTiso4**(2,59-38,53%), **aADHA4**(3,01-33,26%), **aADHA8**(2,88-34,74%) y **aADHA16**(3,28-30,48%) indicándonos en ambos casos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control (**aAITiso4=ALGAL** $p<0,05$) ver figura 19a. Señalar que *Artemia* alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con la formulación **ADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) mostró un coeficiente de correlación $r^2=0,44$ en la TCA, con ajuste a una tendencia lineal positiva, en tanto que con respecto al %EC se obtuvo una $r^2=1$ con ajuste a una tendencia polinomial negativa (figura 19b). Indicar que resultados de TCA de *Artemia* obtenidos en el capítulo 4 de la presente disertación en condiciones como calcio(1,87), selenio(1,67), cobre (1,71) y azufre (1,37) mostraron ser más eficientes con respecto al tratamiento **aAARTiso4**(2,59), en tanto que valores de *Artemia* con magnesio(2,96), silicio(3,07), hierro (2,74) y zinc (2,75) mostraron ser eficientemente muy cercanos al tratamiento **aADHA8**(2,88) (figura 19a); por lo que respecta a el %EC en *Artemia*, hallado en el capítulo 4 en las condiciones magnesio(33,71%), silicio(32,48%), hierro (36,40%) y zinc (36,37%) nos indicaron un menor rendimiento comparado con la condición **aAARTiso4**(38,53%), sin embargo tratamientos como el calcio(53,39%), selenio(60,02%), cobre (58,46%) y azufre (72,95%) mostraron un mejor rendimiento respecto a el.

Los valores de TCA nos indicaron cuan eficiente es *Artemia* vía la microalga cultivada y enriquecida con las diferentes formulaciones para ganar peso o crecer; Lora-Vilchis *et al.*,2004 alimentando con *Isochrysis galbana* var. T-iso obtiene una TCA de 3,60 (con una cantidad de alimento acumulado en los 7 días de cultivo de 557,5 μ g con respecto a los

530,01 y 592,11µg en 9 días del presente estudio con las condiciones **aAARTiso4**(2,59) y **aADHA8**(2,88) respectivamente) valor de eficiencia alto con respecto a los demostrados en el actual estudio. Sin embargo Seixas *et al.*,2009 alimentando con *Rhodomonas lens* y *Tetraselmis suecica* obtiene mayores TCA entre 6,5 y 6,2 respectivamente. El comportamiento de las anteriores variables nos da una idea de cuan importante es la complejidad elemental en la calidad del alimento vía la cadena trófica y su desempeño nutricional sobre variables operacionales de cultivo.

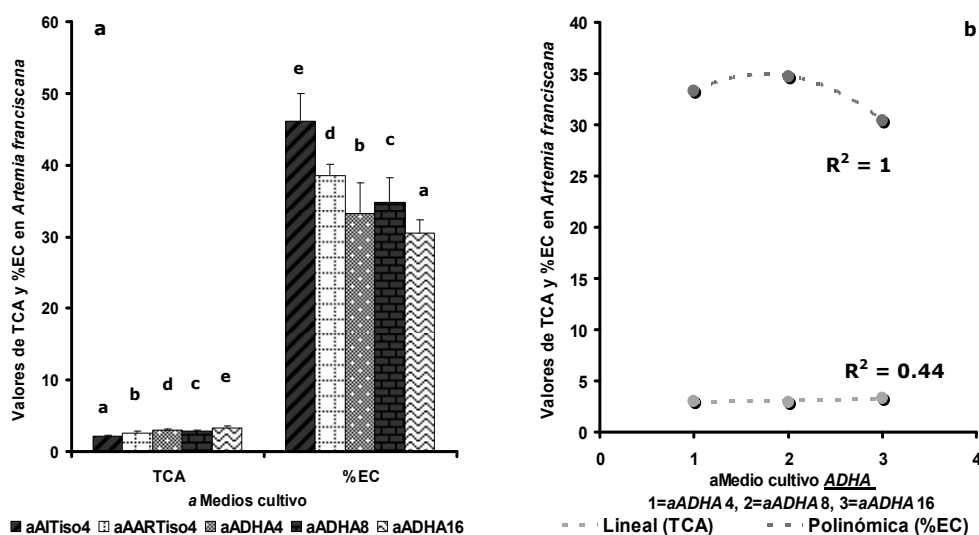


Figura 19.- Tasa de conversión alimenticia (TCA) y porcentaje de eficiencia de crecimiento (%EC) de *Artemia franciscana* alimentada con *Isochrysis galbana* var. T.iso (cultivada y enriquecida con diferentes medios de cultivo) **(a)** y coeficiente de correlación TCA y %EC con la condición **ADHA** 4, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$)

La calidad de *Isochrysis galbana* var. T-iso debida al cultivo e enriquecimiento con diferentes formulaciones, demostró diferentes velocidades de crecimiento (VC) en *Artemia* de: 0,60 mm.día⁻¹(**aAITiso4=ALGAL**), 0,86 mm.día⁻¹ (**aAARTiso4**), 0,72 mm.día⁻¹ (**aADHA4**), 0,96 mm.día⁻¹ (**aADHA8**), 0,96 mm.día⁻¹ (**aADHA16**), demostrándonos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control (**aAITiso4=ALGAL** $p<0,05$) excepto entre las condiciones **aADHA8** y **aADHA16**, siendo además las mejores velocidades de crecimiento. Mencionar que VC obtenidas en *Artemia* del capítulo 4 solo mostraron rendimientos en torno a 0,44 a 0,58 mm.día⁻¹.

Lora-Vilchis *et al.*,2004 en su estudio sobre la tasa de crecimiento en *Artemia* con diferentes dietas obtiene con *Isochrysis galbana* var. T-iso velocidades de crecimiento muy cercanas a nuestros resultados en el rango de 0,32 y 0,96 mm.día⁻¹. Evjemo and Olsen, 1999 en 7 días de crecimiento alimentando *Artemia* con la misma microalga que el presente estudio obtiene una VC media de 0,59. Sick 1976 indica que altas VC en *Artemia* alimentada con *Dunaliella viridis* son debidas a la ausencia de pared celular y al alto contenido de proteína celular y contenido energético, situación similar ocurre con *Isochrysis galbana* var. T-iso sin embargo no son las únicas razones por las cuales el alto valor alimenticio de una

microalga, debiéndose agregar que en el presente estudio el enriquecimiento mineral de la dieta por las diferentes formulaciones, también es un factor el cual influyó en el valor alimenticio de la dieta y por ende en el siguiente nivel trófico.

El peso seco (PS) obtenido por los adultos de *Artemia franciscana* en base a las diferentes formulaciones de cultivo en *Isochrysis galbana* var. T-iso fue muy oscilante obteniéndose los siguientes resultados al T₉: 161,49 µg.artemia⁻¹ (**aAITiso4=ALGAL**), 204,23 µg.artemia⁻¹ (**aAARTiso4**), 178,20 µg.artemia⁻¹ (**aADHA4**), 205,69 µg.artemia⁻¹ (**aADHA8**) y 238,51 µg.artemia⁻¹ (**aADHA16**) (tabla 5); indicándonos en todos los casos la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control (**aAARTiso4** $p<0,05$) ver figura 20a y tabla 5. *Artemia* cultivada con la condición **ADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) expresó un coeficiente de correlación $r^2=0,99$ con ajuste a una tendencia lineal positiva en la generación de PS (figura 20b). Indicar que resultados de PS de las condiciones **aAARTiso4**, **aADHA8** y **aADHA16** fueron superiores a los obtenidos en organismos alimentados con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes elementos (capítulo 4) en torno a 106,53 y 200,09 µg.artemia⁻¹. Los valores de peso seco del presente estudio se correspondieron con la evolución de el peso orgánico (proteínas+lípidos+carbohidratos µg.artemia⁻¹, tabla 5) en el rango de 152,49-225,14 y por ende con el contenido de materia orgánica por adulto de *Artemia* (tabla 5).

Lora-Vilchis et al.,2004 alimentando *Artemia* con *Isochrysis galbana* var. T-iso obtuvo al día 7 solo un peso orgánico de 137,8µg.Artemia⁻¹, Seixas et al.,2009 alimentando con *Nannocloropsis gaditana*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* y *Rhodomonas lens* al T₈ obtuvo pesos entre 25,7 y 111,2 µg.Artemia⁻¹. Evjemo and Olsen, 1999 alimentando *Artemia* con *Isochrysis galbana* var. T-iso por 11 días obtiene un peso seco de 195 µg.Artemia⁻¹. Por otra parte Anh et al.,2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes al día 5 de cultivo obtiene pesos entre 310 y 320µg.Artemia⁻¹.

Ronsón-Paulín et al.,2009 al día 14 de cultivo con *Tetraselmis suecica*, *Nannocloropsis* sp y mezcla de estas con y sin probióticos obtiene pesos entre 140 y 470µg.Artemia⁻¹. Resultados que nos indican que la variabilidad en la calidad nutritiva de la microalga influye en la nutrición y crecimiento del organismo; calidad nutricional que en nuestro estudio fue posible modificar vía el enriquecimiento mineral de la microalga con las diferentes formulaciones de cultivo, lo cual impacto en el desempeño nutricional de *Artemia* para la generación de peso.

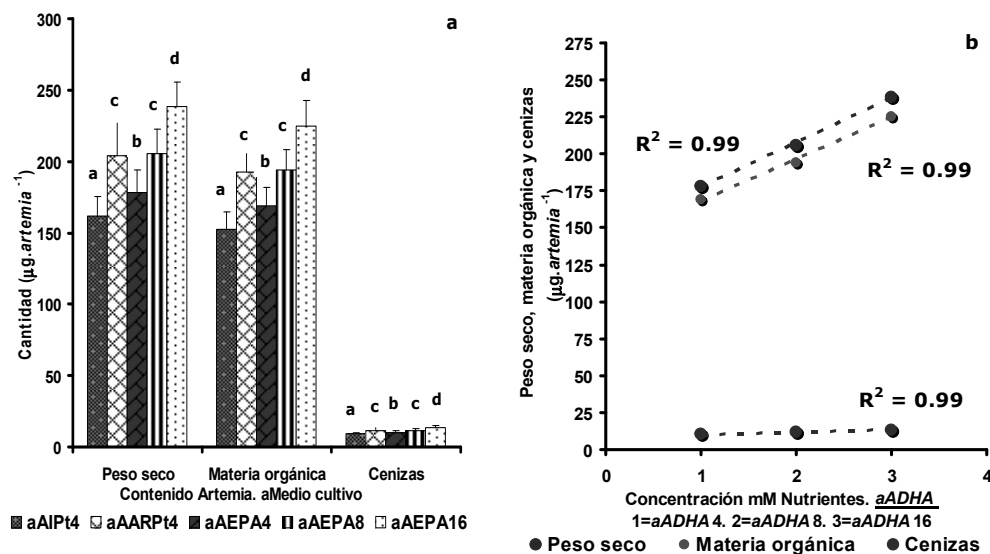


Figura 20.- (a) Contenido *Artemia*: peso seco, materia orgánica y cenizas ($\mu\text{g.}artemia^{-1}$) alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo con respecto a los diferentes medios de cultivo. **(b)** Correlación concentración nutrientes medio de cultivo **ADHA**. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

Respecto al contenido de cenizas por adulto de *Artemia* ($\mu\text{g.}artemia^{-1}$) como se puede observar en la figura 20a y tabla 5, vario con respecto al tipo de formulación de cultivo en *Isochrysis galbana* var. T-iso, de modo que se consiguieron los siguientes resultados: 8,99 (**aAITiso4=ALGAL**), 11,74 (**aAARTiso4**), 10,12 (**aADHA4**), 11,48 (**aADHA8**) y 13,37 (**aADHA16**); indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control (**aAITiso4=ALGAL** $p<0,05$). Dhont and Van Stappen, 2003 mencionan que diversos autores, citan en cultivos de *Artemia* adulta en condiciones de laboratorio porcentajes de cenizas en torno al 5 y 22% con diversos orígenes geográficos, así mismo Anh *et al.*, 2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes indican valores que oscilan entre 15 y 16%. En el presente estudio nuestros resultados se citan en torno al 5 y 6%.

La incorporación de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} y Cu^{2+} por los adultos de *Artemia franciscana* vía *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes formulaciones, se puede observar en la figuras 21 a-b, 22 a-b y tablas 6-7; como se puede observar tales resultados fueron muy variables, lo que nos indicó la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones ($p<0,05$). Tales diferencias concuerdan con la variabilidad de cenizas reportadas en todas las condiciones de cultivo del microcrustáceo, que además son evidentes en el comportamiento del peso seco y orgánico de *Artemia* vía el alimento. Reinfelder *et al.*, 1998, sugieren que la bioacumulación de un elemento se basa en modelos conceptuales sencillos en donde la concentración del elemento en el organismo esta controlada por el equilibrio entre el consumo, eliminación y crecimiento, tal y como ocurre en bivalvos, copépodos, rotíferos y *Artemia* (Wang and Fisher, 1998) y como vía de bioacumulación las microalgas (Lee and Luoma, 1998).

La eficiencia de asimilación en los hidrobiontes es directamente proporcional al contenido citoplasmático del elemento en las células microalgales que sirven de alimento en copépodos y larvas de bivalvos (Reinfelder and Fisher, 1991;1994; Hutchins *et al.*,1995; Wang and Fisher 1996; Chong and Wang 2000; Xu and Wang 2002; Cheung and Wang 2005). La eficacia de *Artemia* como un transportador de bioproductos de importancia dietética en niveles superiores de la cadena trófica es posible, por ejemplo productos liposolubles administrados a través de una emulsión, compuestos solubles en agua a través de liposomas (Hontoria *et al.*,1994; Tonheim *et al.*,2000; Monroig *et al.*, 2003, 2006; Nordgreen *et al.*,2007) portador de microcápsulas (Sakamoto *et al.*,1982; Medina-Reyna *et al.*,2002a, b, c; Ronsón-Paulin, 2003; Medina-Reyna *et al.*,2005); y como demuestra el presente estudio el transporte y bioacumulación indirecta o directa de los anteriores elementos minerales (así como el manganeso) importantes en marcados procesos fisiológicos, de salud, antistress y limitatorios de deformaciones esqueléticas en estadios tempranos y postlarvales de diferentes especies marinas (Lall and Lewis-McCrea, 2007; Nguyen *et al.*,2008, Rider *et al.*,2009).

El enriquecimiento mineral vía la cadena trófica incluso modifica la composición de ácidos grasos y supervivencia de larvas de pargo; lo que sería una importante herramienta biotecnológica a fin de mejorar la calidad de la cría larvaria de peces marinos en laboratorio. La utilidad del método de bioencapsulación por *Artemia* queda comprobada por su análisis químico.

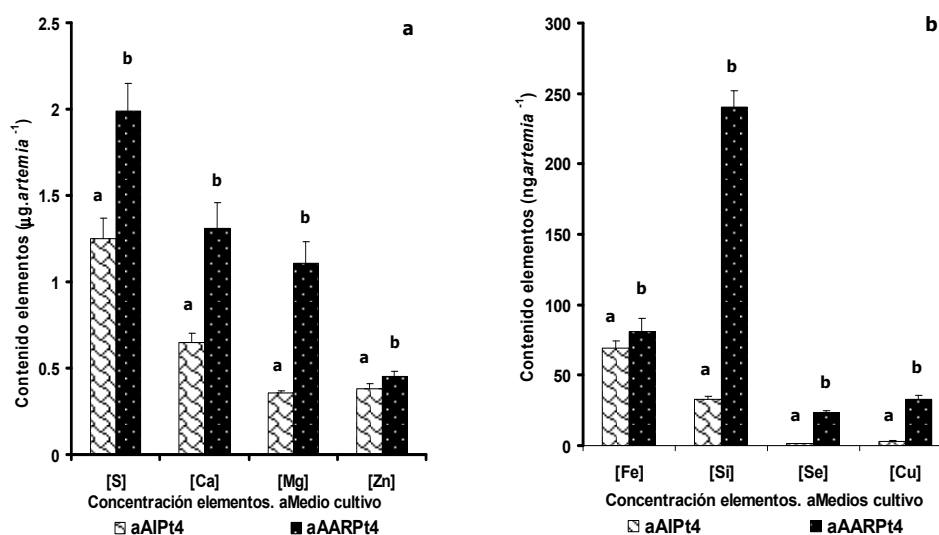


Figura 21. Incorporación de elementos por *Artemia franciscana* alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con **AARTiso4** y **AITiso4**: **(a)** S²⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, **(b)** Fe³⁺, Si⁴⁺, Se²⁻, Cu²⁺. Media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa (p<0,05).

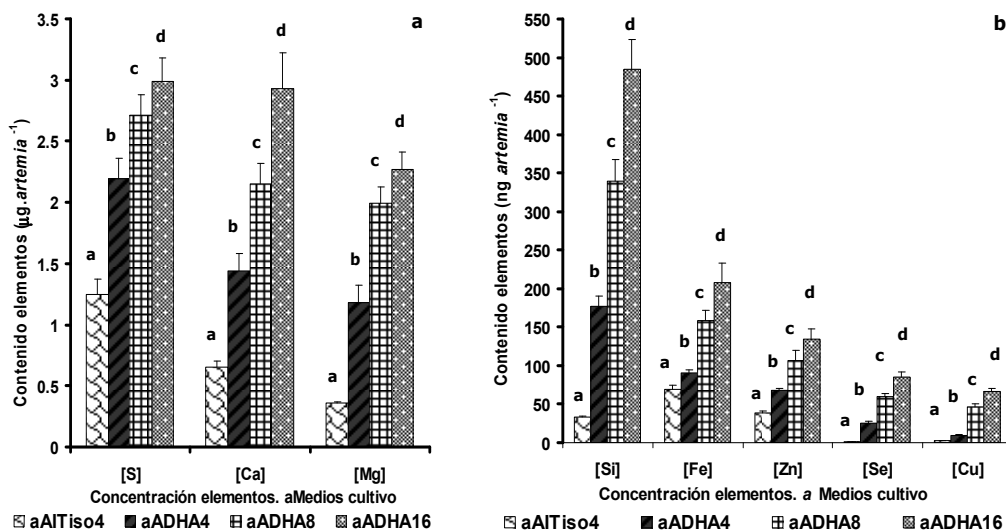


Figura 22.-Incorporación de elementos en *Artemia franciscana* alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con **AITiso4**, **ADHA4**, 8 y 16mM: **(a)** S²⁻, Ca²⁺, Mg²⁺ **(b)** Si⁴⁺, Se²⁻, Cu²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺. Media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa (p<0,05).

Demostrar que en el caso de la alimentación de *Artemia* con el medio de cultivo **ADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8, 16mM) se obtuvieron coeficientes de correlación en la incorporación de S²⁻, Ca²⁺, Mg²⁺ $r^2=0,97$, $0,99$ y $0,93$ respectivamente en todos los casos con ajuste a una tendencia lineal positiva (figura 23a), en tanto que para Si⁴⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, S²⁻, Se²⁻ y Cu²⁺ una $r^2=0,99$, $0,99$, $0,98$, $0,99$ y $0,96$ respectivamente, en todos los casos, con ajuste a una tendencia lineal positiva (figura 23b).

Ciertos minerales como el calcio, fósforo, boro, zinc, cobre, silicio, vanadio, selenio, manganeso estroncio y fluor son necesarios para el normal mantenimiento de las funciones metabólicas y fisiológicas de los organismos vivos. Las principales funciones de los elementos esenciales en el cuerpo del animal incluyen la formación de estructuras esqueléticas, mineralización, mantenimiento de sistemas coloidales, regulación del equilibrio ácido-base, así como el ser componentes importantes de las hormonas, enzimas y proteínas estructurales (Simkiss, 1979; Williams, 1981; Lall, 2002; Lall and Lewis-McCrea, 2007). Villanueva and Bustamente, 2006 mencionan que en la crianza de paralarvas de pulpo con *Artemia*, la presa poseía un contenido de cobre, zinc, magnesio y azufre relativamente bajo, el cual es casi la mitad del perfil encontrado en paralarvas silvestres, lo que sugiere un efecto de la dieta y/o indicación de el pobre estadio fisiológico de las paralarvas alimentadas con *Artemia*, indicando que requieren un alimento rico en tales elementos, es con base en lo anterior que el presente estudio representa una ideal herramienta para revertir deficiencias minerales en el alimento vivo las cuales desemboquen en incrementar tasas de metamorfosis y supervivencia.

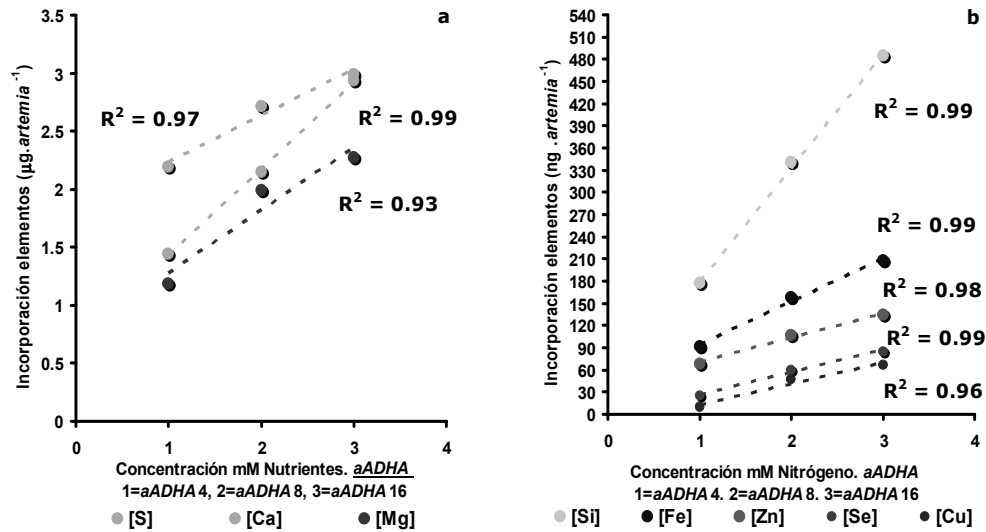


Figura 23.- Coeficientes de correlación en la incorporación de elementos por *Artemia franciscana* alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con el medio **ADHA**4, 8 y 16mM: **(a)** S²⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺ **(b)** Si⁴⁺, Se²⁻, Cu²⁺. Media \pm SD ($n=3$).

Las diferentes formulaciones de cultivo en *Isochrysis galbana* var. T-iso produjeron diferentes efectos como alimento en la composición bioquímica de *Artemia franciscana* de la siguiente manera: la biomasa celular con los medios **AITiso4=ALGAL** y **AARTiso4** mostró la siguiente disposición bioquímica **Proteínas>Carbohidratos>Lípidos** (pg.cel⁻¹), en tanto que en *Artemia* una vez consumida las microalgas la disposición fue **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos**($\mu\text{g. artemia}^{-1}$) en ambos casos (figura 24 a-b); en el caso de la biomasa celular con **ADHA4**, **ADHA8** y **ADHA16** reveló el siguiente orden en la composición proximal **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos** (pg.cel⁻¹), y una vez consumida la microalga por *Artemia* **Proteínas>Lípidos>Carbohidratos** ($\mu\text{g. artemia}^{-1}$) en la totalidad de los casos (figura 25 a-b).

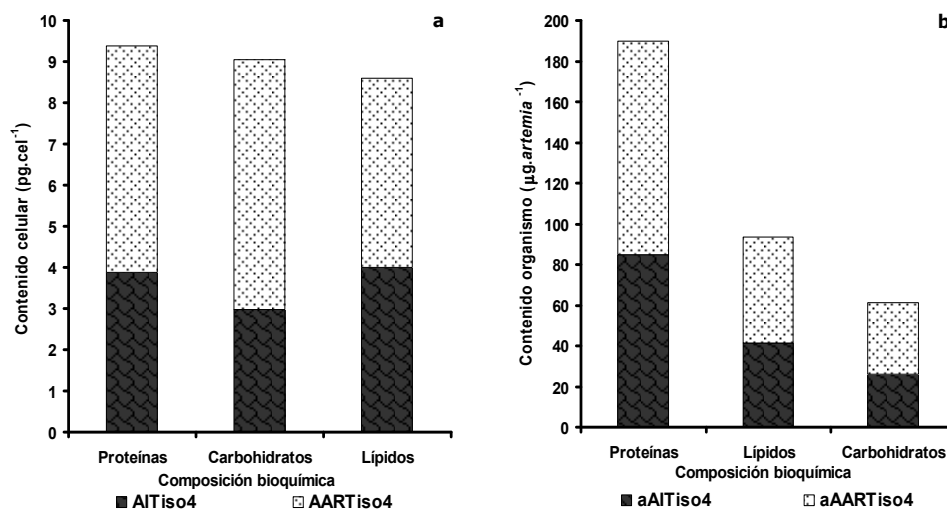


Figura 24. (a) Composición bioquímica de *Artemia franciscana* ($\mu\text{g. artemia}^{-1}$) alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso (pg.cel⁻¹) **(b)** cultivada con **AITiso4=ALGAL** y **AARTiso4**.

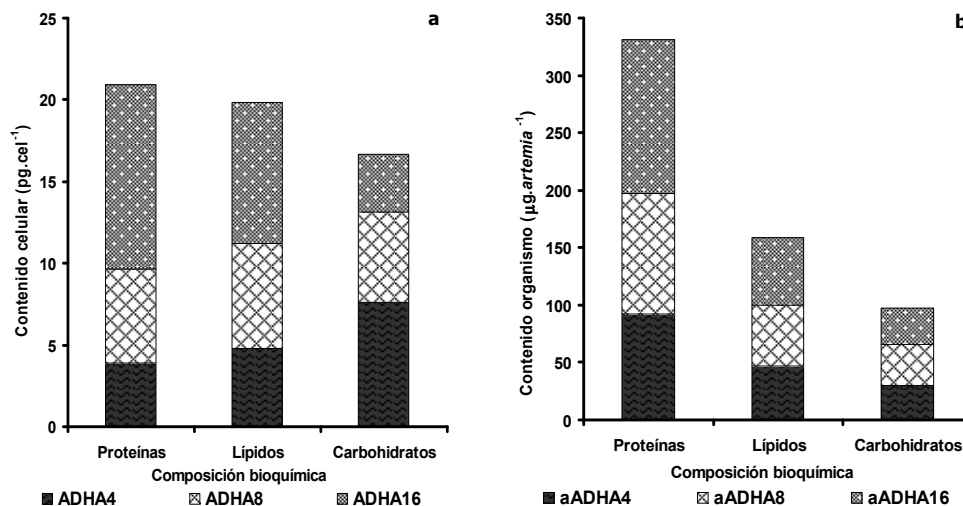


Figura 25. (b) Composición bioquímica de *Artemia franciscana* ($\mu\text{g.artemia}^{-1}$) alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso (pg.cel^{-1}) **(a)** cultivada con **ADHA 4, 8 y 16mM**.

En orden de importancia energética el contenido de proteína en *Artemia franciscana* fue el mayor combustible bioquímico (figura 24 b y 25 b), una vez alimentada con la microalga, cultivada con diferentes formulaciones, mostrando los siguientes valores: $84,92\mu\text{g.artemia}^{-1}$ (**aAITiso4=ALGAL**), $104,95\mu\text{g.artemia}^{-1}$ (**aAARTiso4**), $92,04\mu\text{g.artemia}^{-1}$ (**aADHA4**), $105,30\mu\text{g.artemia}^{-1}$ (**aADHA8**) y $134,05\mu\text{g.artemia}^{-1}$ (**aADHA16**); existiendo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) ver tabla 5 y figura 26a. Mencionar que en el capítulo 4 de la presente disertación, la condición *Artemia* enriquecida con silicio ($92,77 \mu\text{g.artemia}^{-1}$) selenio ($105,48 \mu\text{g.artemia}^{-1}$) y azufre ($122,59 \mu\text{g.artemia}^{-1}$), mostraron rendimientos muy similares con **aADHA4**, **aADHA8** y **aADHA16** respectivamente. Por otra parte la condición **aADHA 4, 8 y 16** reveló un coeficiente de correlación proteico con respecto a la concentración de nutrientes $r^2=0,96$ con ajuste a una tendencia lineal positiva (figura 26b) .

En tanto que el segundo combustible lo constituyó el contenido de lípidos (figura 24 b y 25 b) con los siguientes valores: $41,33\mu\text{g.artemia}^{-1}$ (**aAITiso4=ALGAL**), $52,39\mu\text{g.artemia}^{-1}$ (**aAARTiso4**), $46,62\mu\text{g.artemia}^{-1}$ (**aADHA4**), $53,20\mu\text{g.artemia}^{-1}$ (**aADHA8**) y $59,37\mu\text{g.artemia}^{-1}$ (**aADHA16**) (tabla 5), indicando diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) ver tabla 5 y figura 26a. Indicar que en el capítulo 4 el comportamiento de los lípidos en *Artemia* con las diferentes dietas elementales mostró valores inferiores a los antes descritos en torno a 26,31 y 50,50 $\mu\text{g.artemia}^{-1}$. La condición **aADHA 4, 8 y 16** reveló un coeficiente de correlación lipídico con respecto a la concentración de nutrientes $r^2=0,99$ con ajuste a una tendencia lineal positiva (figura 26b).

Por lo que concierne a los carbohidratos (CHOs) (figura 24 b y 25 b) valores de 26,24, 35,13, 30,02, 35,71 y 31,72 $\mu\text{g.} \text{artemia}^{-1}$ estuvieron presentes en *aAITiso4*, *aAARTiso4*, *aADHA4*, *aADHA8* y *aADHA16* comparativamente (tabla 5); indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre *aAARTiso4* y *aAEPA8* ver tabla 5 y figura 26a. Los anteriores resultados estuvieron por encima de los obtenidos en el capítulo 4 en torno a 21,90 y 29,54 $\mu\text{g.} \text{artemia}^{-1}$ para hierro, cobre, azufre, zinc y selenio, en tanto que magnesio (30,72), calcio (35,69) y silicio (31,09) indicaron ser muy similares a *aAARTiso4*, *aADHA4*, *aADHA8* respectivamente. Mencionar que el tratamiento *aADHA 4, 8 y 16* reveló un coeficiente de correlación (CHOs) con respecto a la concentración de nutrientes $r^2=1$ con ajuste a una tendencia polinomial (figura 26b).

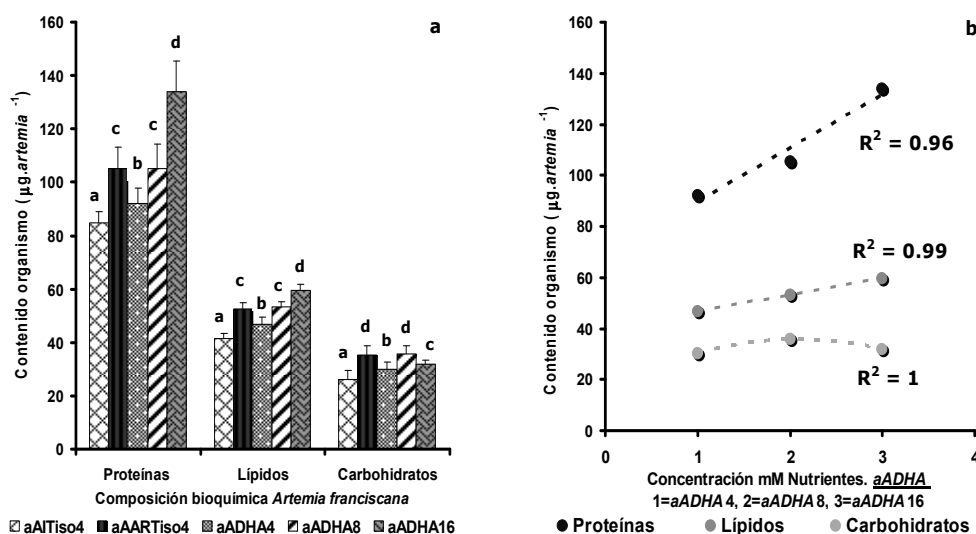


Figura 26. (a) Contenido *Artemia franciscana* ($\mu\text{g.} \text{artemia}^{-1}$) de proteínas, carbohidratos y lípidos, alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficientes de correlación *aADHA4,8,16*. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

Cuando se consideró el contenido de proteína, como porcentaje de la fracción orgánica (FOP), se observaron los siguientes valores: 55,69% (*aAITiso4=ALGAL*), 54,52% (*aAARTiso4*), 54,56% (*aADHA4*), 54,22% (*aADHA8*) y 59,54% (*aADHA16*) ver figura 27 y tabla 5. Dichos porcentajes de proteína en *Artemia franciscana* fueron muy similares a las condiciones silicio (51,55%), calcio (54,72%), magnesio (55,52), zinc (52,92%) y hierro (51,45%) descritas en el capítulo 4; sin embargo tratamientos con azufre (64,88%) y selenio (61,28%) estuvieron por el encima del rendimiento obtenido con *aADHA16* (59,54%). Seixas *et al.*, 2009 en juveniles de 5 días alimentados con *Tetraselmis suecica* y *Rhodomonas lens* obtuvieron entre un 63 y 68% respectivamente, en tanto que Anh *et al.*, 2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes describe entre un 55 y 56%. Los valores del presente estudio están dentro del rango descrito por Dhont and Van Stappen, 2003 para adultos de *Artemia* con un 39-67%. Los adultos de *Artemia* poseen una mayor cantidad de proteína que los nauplios, esto es debido a la dieta; así como un

mayor contenido de los 10 principales aminoácidos esenciales, y que son considerados como necesarios por las larvas de peces.

En comparación con los lípidos, muy poca investigación se ha realizado sobre el papel y necesidades de proteínas en la nutrición larval, a pesar del hecho de que el catabolismo de los aminoácidos es la mayor fuente de energía en larvas de peces (Dabrowski 1983) y que los aminoácidos son esenciales para la síntesis de proteínas y enzimas (Conceição 1997). Por otra parte, las larvas parecen tener mayores necesidades de aminoácidos que los peces juveniles o adultos (Dabrowski 1986; Fiogbé and Kestemont 1995). Aunque se cree que *Artemia* contiene niveles adecuados de la mayoría de los aminoácidos, la fracción de aminoácidos libres es baja en comparación con los niveles de copépodos silvestres (Tonheim *et al.*, 2000), especialmente en metionina. Conceição *et al.*, 1997 observaron el retraso en el crecimiento en larvas de rodaballo alimentados con *Artemia* y se sospecha es relacionado con la deficiencia de metionina.

En lo que se refiere a la fracción orgánica de los lípidos (FOL) (ver figura 27 y tabla 5) estos revelaron los siguientes porcentajes: 27,10% (**aAITiso4=ALGAL**), 27,22% (**aAARTiso4**), 27,64% (**aADHA4**), 27,39% (**aADHA8**) y 26,37% (**aADHA16**). Resultados que mostraron un mejor rendimiento comparado con las condiciones selenio (21,78%), calcio (24,23), magnesio (22,88), azufre (19,48%), zinc (25,90%) y hierro (26,20%) descritas en el capítulo 4; en tanto que *Artemia* con la condición cobre (32,36%) expresó un mejor rendimiento lipídico con respecto a los tratamientos del presente estudio.

Zhukova *et al.*, 1998 indican que los porcentajes de asimilación de lípidos en *Artemia* responden a la variedad y calidad bioquímica encontrada en la especie microalgal con que fue alimentada; en nuestro estudio tal calidad del alimento dependió de su cultivo con diferentes formulaciones. Seixas *et al.*, 2009 alimentando juveniles por 5 días con *Rhodomonas lens* y *Tetraselmis suecica* demuestra un contenido entre 12 y 15%, Anh *et al.*, 2009 en cultivos extensivos con alimentación en base al método de aguas verdes obtiene porcentajes en torno al 14%, en tanto que Dhont and Van Stappen, 2003 citan que varios autores han descrito porcentajes lipídicos en adultos en torno al 4 y 31% y en carbohidratos obtienen entre un 4 y 20%, valores dentro de los cuales caen los resultados para esa fracción en el presente estudio con un comportamiento entre el 14,09 y 18,39% (figura 27 y tablas 5). Anh *et al.*, 2009 reporta porcentajes entre un 14 y 15%.

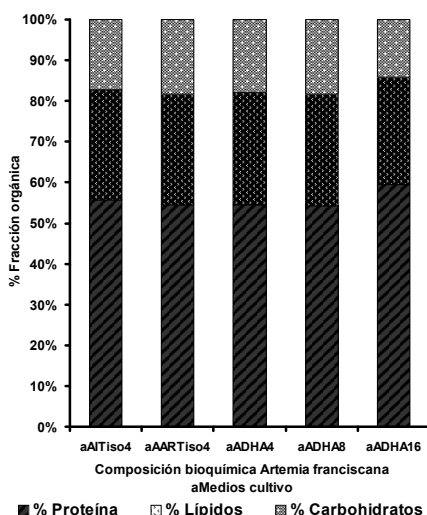


Figura 27.- Fracción orgánica de proteínas, lípidos y carbohidratos en *Artemia franciscana* alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo con diferentes medios de cultivo.

En lo que se refiere al valor calórico (VC) por *Artemia* en base a la calidad nutricional de *Isochrysis galbana* var. T-iso vía las diferentes formulaciones de cultivo, se obtuvieron los siguientes resultados: $4,12 \times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$ (**aAITiso4=ALGAL**), $5,19 \times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$ (**aAARTiso4**), $4,56 \times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$ (**aADHA4**), $5,24 \times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$ (**aADHA8**) y $6,10 \times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$ (**aADHA16**) indicando la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) (tabla 5) excepto entre las condiciones **aAARTiso4** y **aADHA8**. Observar que resultados de las condiciones **aAARTiso4**, **aADHA8** y **aADHA16** se encontraron por encima de los obtenidos en el capítulo 4, los cuales estuvieron en torno a $2,60$ y $4,90 \times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$. Los valores aquí descritos de VC superan los referidos por Seixas *et al.*, 2009 en su estudio de alimentación con *Tetraselmis suecica* y *Rhodomonas lens* al T₅ con $1,16$ y $1,35 \times 10^{-6} \text{J.artemia}^{-1}$. Demostrando nuestros resultados que la calidad del alimento de *Artemia* vía el enriquecimiento mineral en la microalga dadas las diversas formulaciones demuestra diversos grados de calidad de *Artemia* en cultivo.

El contenido de ácidos grasos en *Artemia franciscana* fue modulado por la calidad de *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada y enriquecida con diferentes formulaciones (capítulo 6); donde los ácidos grasos (AG) más abundantes entre un 5,41 y 31,77% están representados por el 14:0, 16:0, 16:1(n-7), 18:0, 18:1(n-9), 18:1(n-7) estimándose en conjunto en un 74,11-86,38% del total, resultados que superan los establecidos por Dhont and Van Stappen, 2003, con un 40-60% empleando diversas dietas microalgales. Resultados muy cercanos al presente estudio fueron obtenidos en el capítulo 4 en torno a un 67,59-86,18%. Seixas *et al.*, 2009 mencionan que alimentando con diferentes microalgas el ácido graso saturado más abundante es el 16:0, sin embargo en el presente estudio el AG más abundante en *Artemia* fue el 18:1(n-9) entre un 28,20 y 31,77% reflejo de su abundancia en *Isochrysis galbana* var. T-iso (capítulo 2); Nelson *et al.*, 2004 enriqueciendo juveniles de *Artemia* de 5 días con *Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis galbana* obtiene valores de entre un 22-28%. Léger *et al.*, 1986 menciona que son varias las publicaciones que incluyen 15 o más diferentes ácidos grasos, pero únicamente seis (16:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3 y 20:5n-3) de ellos representan alrededor del 80% del total de AG en una muestra de *Artemia*. En el presente estudio derivado de las diferentes formulaciones de cultivo hallamos entre 63,44 y 67,58% (tabla 8). Estevez *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2000 mencionan que algunos autores también han detectado niveles significativos del AG 18:1n-7, el cual en el presente estudio estuvo presente entre el 5,96 y 8,31% (tabla 8), valores que son debidos probablemente reflejo de una mayor resolución cromatográfica. El ácido oleico (18:1n-9) es otro de los AG más abundantes (Støttrup and McEvoy, 2003), el cual en este estudio fue detectado entre un 28,20 y 31,77%. Otros AG poliinsaturados en conjunto de cadena corta entre un 11,59 y 19,99% son el 18:2(n-6), 18:3(n-3), 18:4(n-3) (Zhukova *et al.*, 1998); en tanto ácidos grasos en conjunto con más de 20 carbonos representan un rango de entre 1,54 y 4,26%; siendo el 20:3(n-5), 20:4(n-6 AA), 20:5(n-3EPA) y 22:6(n-3DHA). Donde el AG AA fue posible detectarlo entre un 1,53 y 2,72%, en tanto que Seixas *et al.*, 2009 alimentando con otras microalgas obtiene una concentración solo de 0,4%. Zhukova *et al.*, 1998 indica

que el metabolismo de los lípidos en *Artemia* es poco conocido ya que se ha observado la capacidad de este microcrustáceo para poder sintetizar mayores cantidades *de novo* de 16:0 y 18:0 que los encontrados en la dieta (capítulo 6), tal y como resultado evidente con el 18:0 en el presente estudio (tabla 8). Cada formulación para el cultivo de *Isochrysis galbana* var. T-iso que sirvió de alimento para *Artemia franciscana* mostró diversos grados de evolución respecto a incrementar o decrecer porcentualmente tales AG.

En la presente disertación destaca por su importancia el ácido graso docosahexaenoico (22:6(n-3) DHA) que forma parte del equilibrio DHA:EPA en la normal pigmentación de larvas de peces planos entre otros procesos. DHA estuvo presente en los adultos de *Artemia* con los siguientes valores: 0,48% (**aAITiso4=ALGAL**), 0,61% (**aAARTiso4**), 0,63% (**aADHA4**), 0,54% (**aADHA8**) y 0,44% (**aADHA16**) mostrándonos la existencia de diferencias significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) excepto entre las condiciones **aAARTiso4** y **aADHA4**, ver tabla 8 y figura 28a. Se observó un decremento del contenido de DHA con respecto a un incremento de nutrientes de la dieta **ADHA** (4, 8 y 16mM), lo cual se ajustó a una tendencia lineal negativa con un coeficiente de correlación $r^2=0,99$ (figura 28b). Indicar que en el capítulo 4 *Artemia* alimentada con las condiciones Mg^{2+} (0,48%), Ca^{2+} (0,58%) y Se^{2-} (0,54%), expresaron rendimientos menores en comparación con las condiciones **aAARTiso4** (0,61%) y **aADHA4** (0,63%), en tanto que tratamientos con Fe^{3+} (0,67%), S^{2-} (0,82%), Zn^{2+} (1,07%), Cu^{2+} (0,74%), revelaron un mejor rendimiento. Mencionar que el contenido porcentual de DHA y EPA en la dieta microalgal cultivada con diferentes formulaciones (capítulo 6); en la totalidad de los casos estuvo por encima de los valores porcentuales encontrados en *Artemia* una vez alimentada mismo comportamiento describió Zhukova *et al.*,1998 inclusive indicando la desaparición del DHA en adultos de 2 semanas de edad; Olsen *et al.*, 1997 indican que después de 3 días de cultivo de juveniles de *Artemia* alimentados con *Isochrysis galbana* var. T-iso se observó una disminución en ellos, de entre un 84-92% de DHA, en tanto un 31-57% en EPA, tal disminución es debida a que este microcrustáceo posee una marcada propensión a retroconvertir ácidos grasos de cadena larga a corta (Evjemo *et al.*,1997; Navarro *et al.*, 1999) tanto en cantidad como en calidad, en función del tiempo de enriquecimiento o alimentación, lo que nos indicaría que los emplea en procesos de crecimiento y maduración sexual, que son indicativos de los valores ya descritos de TCA y %EC. Seixas *et al.*,2010 enriqueciendo juveniles de *Artemia* con una mezcla de *Rhodomonas lens* e *Isochrysis galbana* obtiene un 1,6% de DHA, lo cual promovió una mayor supervivencia de paralarvas de *Octopus vulgaris*.

La discusión anterior coincide con los valores de ARA encontrados en los adultos de *Artemia* los cuales mostraron los siguientes resultados: 2,51% (**aAITiso4=ALGAL**), 2,69% (**aAARTiso4**), 1,98% (**aADHA4**), 1,54% (**aADHA8**) y 2,72% (**aADHA16**) (tabla 8) con respecto a 1,62% (**AITiso4=ALGAL**), 0,95% (**AARTiso4**), 0,29% (**ADHA4**), 0,40% (**ADHA8**) y 0,48% (**ADHA16**) hallado en *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada e enriquecida con los diferentes medios de cultivo (capítulo 6).

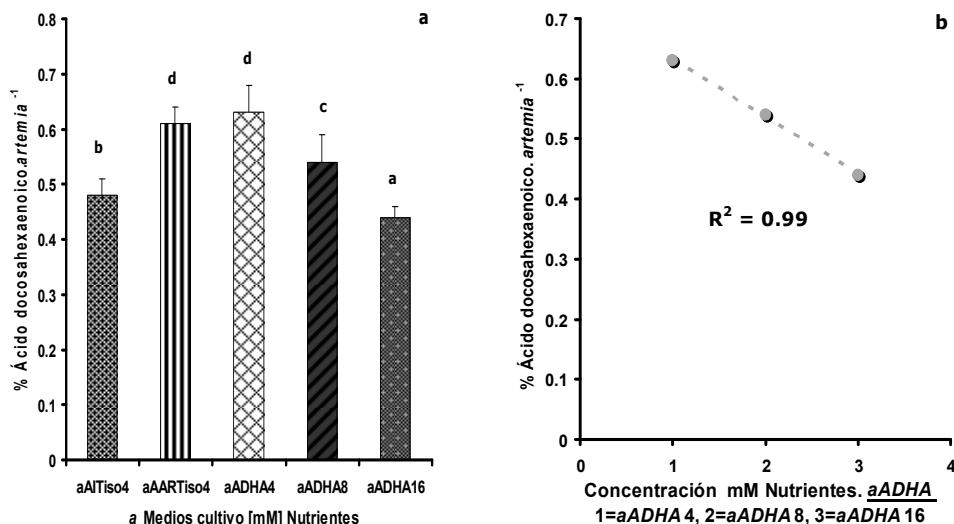


Figura 28. Contenido de Ácido docosahexaenoico en *Artemia franciscana* alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con diferentes medios de cultivo (a) y coeficientes de correlación DHA con el medio ADHA4, 8 y 16mM (b). Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

El contenido de AGT $\mu\text{g.Artemia}^{-1}$ que correspondió del contenido lipídico de *Artemia franciscana*, alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada e enriquecida con las diferentes formulaciones fue el siguiente: **aAITiso4=ALGAL**(29,88%), **aAARTiso4**(19,39%), **aADHA4**(25,12%), **aADHA8**(17,97%) y **aADHA16**(13,95%). Indicar que el tratamiento **aADHA4** (25,12%) reveló un mejor rendimiento comparado con los resultados obtenidos en el capítulo 4 en las condiciones Ca^{2+} (24,73%), Fe^{3+} (21,25%), S^{2-} (10,92%), Zn^{2+} (17,67%) y Cu^{2+} (19,78%); en tanto que los tratamientos Mg^{2+} (37,94%), Si^{4+} (28,35%) y Se^{2-} (25,49%) expresaron un mejor rendimiento. Bell *et al.*, 2003 sugieren que existen dificultades en el apropiado enriquecimiento de *Artemia* con EPA y DHA lo que es un importante obstáculo para su idoneidad como presa viva en la alimentación de larvas de peces marinos. La pobre capacidad de enriquecimiento con EPA y DHA puede ser explicada por el alto contenido de lípidos libres antes y después del enriquecimiento especialmente triacilglicerol(3,9%), metil y ethylalkylketonas con pequeñas concentraciones de monoacilglicerol, diacilglicerol, esterol, esterol esterol, y en particular ácidos grasos libres de escaso valor nutritivo (Volkman *et al.*, 1981; Takeuchi *et al.*, 1992; McEvoy *et al.*, 1996; Zhukova *et al.*, 1998); que en el presente estudio dados los valores de DHA Y EPA fue posible corregir en baja escala mediante la calidad y riqueza de fosfolípidos por el alimento con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada e enriquecida con diferentes medios de cultivo (tabla 8). Es en base a nuestros resultados que observamos cuan importante y variable resulta ser la diversidad mineral de los medios de cultivo en la modificación del perfil bioquímico en la cadena trófica. McEvoy *et al.*, 1996; Dhont and Van Stappen, 2003; mencionan que los tiempos de enriquecimiento o crecimiento en *Artemia* influyen en calidad y cantidad de los lípidos presentes variando de un 23 a un 17% los fosfolípidos y de un 58 a un 64% los triacilglicerol, situación que nos explicaría la disminución del porcentaje de EPA y DHA en *Artemia* con respecto a la dieta.

Se encontraron diferencias en el contenido porcentual y $\mu\text{g.} \text{artemia}^{-1}$ de los ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGM) y poliinsaturados (AGP), existiendo en todos los casos diferencias significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo experimentadas ($p<0,05$) ver *tabla 8* y *figura 29a*. Señalar que en el caso de la condición **aADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) la evolución de dichos ácidos grasos expresó en el caso de los AGS un coeficientes de correlación $r^2=0,79$, con ajuste a una tendencia lineal negativa, en tanto que los AGP indicaron un $r^2=0,71$, con ajuste a una tendencia lineal positiva; en lo que se refiere a los AGM un $r^2=0,87$ con ajuste a una tendencia lineal positiva (*figura 29b*).

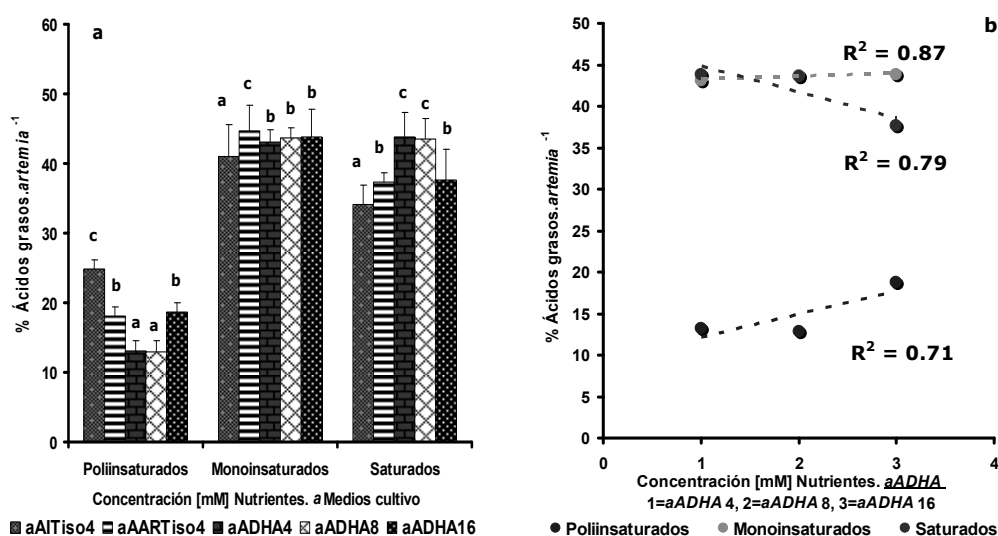


Figura 29. (a) Contenido porcentual de Ácidos grasos por *Artemia franciscana* alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo y una tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficientes de correlación ácidos grasos, condición de cultivo **aADHA** 4, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

La proporción porcentual de los AG **DHA:EPA** en los adultos de *Artemia* estudiados en base a las diferentes formulaciones de cultivo e enriquecimiento mineral en *Isochrysis galbana* var. T-iso reveló los siguientes resultados: 1,34:1% (**aAITiso4=ALGAL**), 1,56:1% (**aAARTiso4**), 1,96:1% (**aADHA4**), 2,08:1% (**aADHA8**) y 0,88:1% (**aADHA16**) (*tabla 8*) mostrándonos la existencia de diferencias significativas ($p=0,001$) entre las condiciones y con respecto al control ($p<0,05$) ver *tabla 8* y *figura 30a*. Se observó un comportamiento lineal negativo $r^2=0,67$ con respecto al contenido de DHA en *Artemia*, cuando se empleó la condición de cultivo **ADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) (*figura 30b*). Reitan *et al.*, 1994b en Sargent *et al.*, 1999 logra eliminar la mal pigmentación de larvas de rodaballo incluyendo aceite refinado de atún rico en DHA en proporción **DHA:EPA** 2:1%. Es de destacar que tal razón es esencialmente la misma proporción de DHA:EPA que existe en la yema de muchos huevos y larvas de peces marinos (Tocher and Sargent, 1984). Aun cuando algunos de nuestros resultados (*tablas 8*) con excepción de adultos cultivados e enriquecidos con **ADHA4** (1,96:1%) y **ADHA8** (2,08:1%), estuvieron por debajo de la proporción DHA:EPA 2:1%, es de destacar que fueron \geq a los valores descritos por Ando *et al.*, 2004 enriqueciendo metanauplios de *Artemia* con aceites de pescado ricos en ácidos

grasos ethyl ésteres en torno al 1,4:1%. Altas mortalidades y pobre crecimiento se ha observado en general asociado cuando existe un desequilibrio entre los lípidos y ácidos grasos, como un bajo contenido de DHA o una razón DHA:EPA inferior a 1,5 (Navarro and Villanueva, 2003; Villanueva and Norman, 2008)

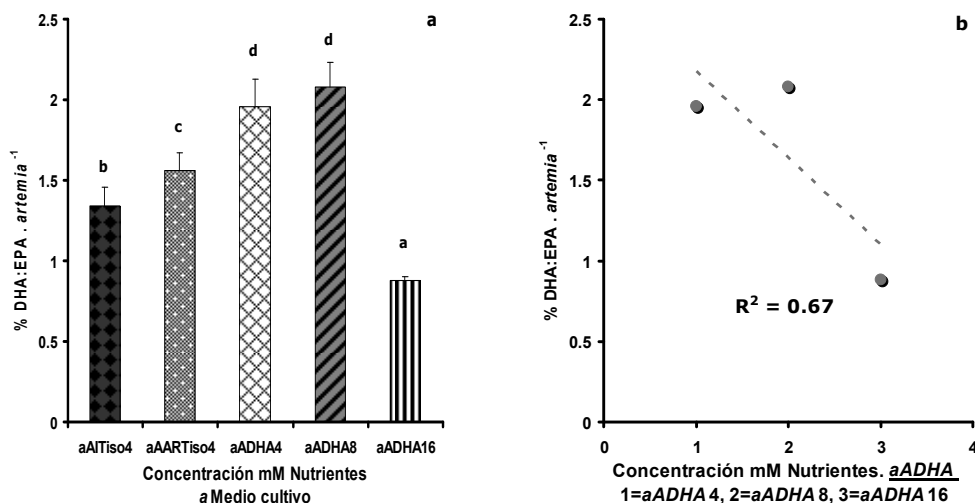


Figura 30. (a) Contenido porcentual de Ácidos grasos **DHA:EPA** en *Artemia franciscana* alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficiente de correlación ácidos grasos **DHA:EPA**, medio de cultivo **ADHA**4, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existen diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

Los peces marinos contienen grandes cantidades de ácido docosahexaenoico (22:6 n-3 DHA) eicosapentaenoico (20:5n-3 EPA) en los fosfolípidos de las membranas celulares. Los peces marinos no pueden biosintetizar DHA *de novo*, ni de los precursores de cadena más corta, como es el ácido alfa-linolénico (18:3 n-3). Por lo tanto, DHA y EPA serán componentes esenciales de la dieta en los peces marinos. El DHA está presente en concentraciones muy elevadas en las membranas de células neuronales y visuales, particularmente en las membranas celulares externas así como membranas sinaptosomales, en peces como en mamíferos (Sargent *et al.*,1997, 1999).

Por lo tanto, una insuficiencia de DHA en la dieta en etapas larvales tempranas de peces marinos es que puede perjudicar el desarrollo neurológico y visual con graves consecuencias para una serie de procesos fisiológicos y de comportamiento incluyendo los que dependen neuroendocrinológicamente.

Pigmentación anormal es común en los cultivos de larvas de peces planos marinos, y se puede mejorar sustancialmente rectificando el nivel de DHA en las larvas mediante el alimento vivo (Kanazawa *et al.*,1981; Kanazawa, 1993; Reitan *et al.*,1994b; McEvoy *et al.*, 1998b). Se ha considerado que la mal pigmentación puede ser consecuencia de un mal funcionamiento neuronal o visual, por ejemplo, de procesamiento anormal de las señales visuales, ya sea en el propio ojo, o posteriormente en el cerebro, desde la producción anormal de la hormona estimulante de melanocitos en el cerebro, de frente a perturbaciones en las conexiones sinápticas entre los nervios y el melanóforos en la piel. El síndrome de mal pigmentación es causado por una deficiencia de DHA o un exceso de EPA, por lo que diversos

autores han documentado la importancia de una alta razón DHA:EPA (Kraul, 1993; Mourente *et al.*, 1993; Reitan *et al.*, 1994b; Lavens *et al.*, 1995).

Los AGP se subdividen en tres familias, mediante las cuales se derivan los procesos de elongación y desaturación mediante las series ω -9, ω -6 y ω -3; de los cuales las series importantes son la ω -3 y ω -6, así mismo la proporción entre estas dos series es de relevante importancia en el valor energético en cada uno de los niveles tróficos, aspecto que se ha descuidado en la nutrición de organismos marinos (Estévez *et al.*, 1999), por lo que una mayor proporción de los ω -3 en la cadena trófica es imprescindible en efectivos mecanismos formadores de membrana durante la metamorfosis de organismos marinos (Reitan *et al.*, 1994; Estévez and Kanazawa, 1995).

Es así que las proporciones de ácidos grasos ω -3: ω -6 por *Artemia franciscana* mostraron diferencias significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de experimentación (**aAARTiso4**, **aADHA4**, **aADHA8** y **aADHA16**) con respecto al control (**aAITiso4=ALGAL**) ($p<0,05$), excepto entre **aAARTiso4=ALGAL** y **aADHA4**, ver *tablas 8* y *figura 31a*. La proporción porcentual de los AG ω -3: ω -6 en *Artemias* estudiadas, se encontró entre 1,23:1% y 1,59:1% (*tabla 8*). Indicar que tal razón ω -3: ω -6 en *Artemia* con las condiciones **aAARTiso4=ALGAL**, **aAARTiso4** y **aADHA4** fue ligeramente superior comparada con la proporción encontrada en el alimento (capítulo 6); en tanto que el alimento en las condiciones **ADHA8** y **ADHA16** fue superior comparado con los organismos que lo consumieron. Se consiguió un índice de correlación $r^2=0,41$ (*figura 30b*) con ajuste a una tendencia lineal negativa en la condición **aADHA** respecto a dicha razón, cuando se incremento la concentración de nutrientes (4, 8, y 16 mM).

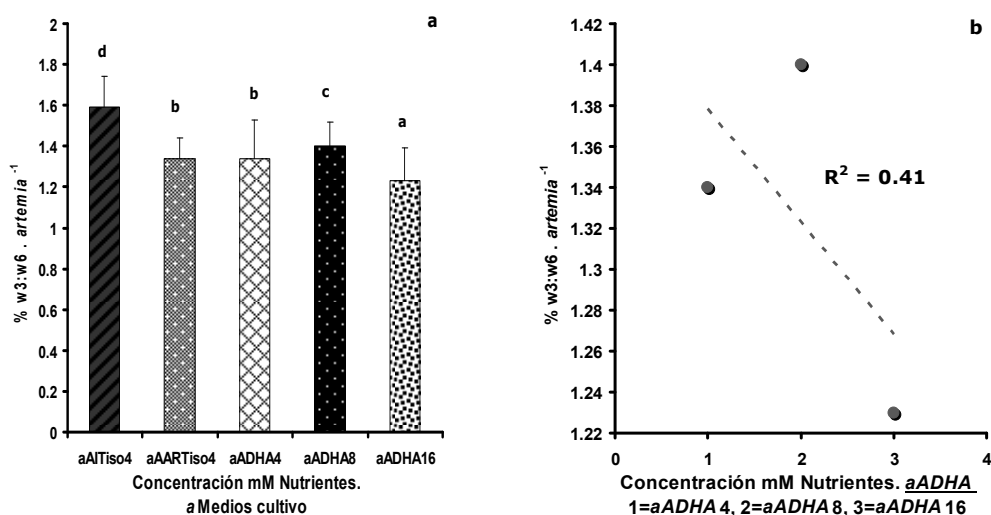


Figura 30. (a) Contenido porcentual de Ácidos grasos $w3:w6$ en *Artemia franciscana* alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso en cultivo semicontinuo y tasa de renovación del 30%.día⁻¹ con diferentes medios de cultivo. **(b)** Coeficiente de correlación ácidos grasos $w3:w6$, medio de cultivo **ADHA4**, 8 y 16mM. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existen diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

Tabla 1

Cultivo del Rotífero *Brachionus plicatilis* alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso con Algal de Alto Rendimiento (AAR) y Algal de Incremento de la Cantidad de DHA (ADHA) (cultivo semicontinuo) (modificado de Fábregas et al., 1984).

Concentración de nutrientes 4, 8, 16 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹

	<i>rAITiso4</i>	<i>rAMPTiso4</i>	<i>rADHA4</i>	<i>rADHA8</i>	<i>rADHA16</i>
Densidad celular (10⁶ cél.mL⁻¹ std)	33,50 ±3,15	99,25 ±7,46	106,75 ±9,42	138,75 ±11,29	129,40 ±12,15
Productividad (10⁹ céls.L⁻¹.día⁻¹)	10,05 ±0,82	29,77 ±2,19	32,02 ±2,92	41,62 ±3,17	38,82 ±2,97
F.O. celular					
%proteína en F.O.	30,12	21,91	35,10	31,13	43,65
% carboh. en F.O.	28,40	41,43	38,24	42,19	20,81
% lípidos en F.O.	41,48	36,65	26,66	26,67	35,53
F.O. Rotíferos					
%proteína en F.O.	62,01	60,98	54,86	56,45	58,60
% carboh. en F.O.	14,02	15,29	19,47	16,47	15,29
% lípidos en F.O.	23,97	23,73	25,67	27,07	26,11
Proteínas (pg.célula⁻¹ ± std)	3,87 ±0,40	5,50 ±0,14	3,90 ±0,20	5,75 ±0,23	11,28 ±1,02
Carbohidratos (pg.célula⁻¹ ± std)	2,98 ±0,26	6,07 ±0,51	7,62 ±0,71	5,49 ±0,23	3,55 ±0,34
Lípidos (pg.célula⁻¹ ± std)	4,00 ±0,24	4,59 ±0,57	4,77 ±0,44	6,45 ±0,22	8,62 ±0,79
Peso orgánico (pg.cel⁻¹)	10,85	16,16	16,29	17,69	23,45
Proteínas (ng.rotífero⁻¹ ±std)	127,07a ±10,58	134,04b ±11,20	142,59c ±13,02	151,19d ±14,60	157,66e ±16,17
Carbohidratos (ng.rotífero⁻¹ ±std)	28,73a ±1,13	33,62b ±1,66	50,61e ±1,59	44,12d ±1,75	41,14c ±1,49
Lípidos (ng.rotífero⁻¹ ±std)	49,12a ±2,44	52,16b ±3,71	66,72c ±4,07	72,50e ±4,57	70,27d ±3,50
Peso orgánico (ng.rotífero⁻¹)	204,92	219,82	259,92	267,81	269,07
Valor calórico (10⁻⁷ J.célula⁻¹)	3,02	4,17	4,11	4,13	6,73
Valor calórico (10⁻⁷ J.rotífero⁻¹)	54,79a	58,50b	69,20c	72,46d	72,62d
Peso seco (µg.mL⁻¹ ±std)	1275,53 ±126,44	2499,47 ±242,72	2642,47 ±215,87	3478,00 ±263,56	2498,67 ±31,86
Peso seco (pg.cel⁻¹ ±std)	12,96 ±1,53	19,63 ±1,34	19,84 ±1,42	21,93 ±2,06	29,01 ±2,28
Peso seco (ng.rotífero⁻¹ ±std)	211,37a ±15,24	227,05b ±16,00	269,38c ±16,10	277,96d ±15,50	279,46e ±16,33
Cenizas (pg.cel⁻¹ ±std)	2,11 ±0,15	3,47 ±0,26	3,55 ±0,39	4,24 ±0,38	5,56 ±0,32
Cenizas (ng.rotífero⁻¹ ±std)	6,45a ±0,49	7,23b ±0,57	9,46c ±0,40	10,15d ±1,49	10,39d ±0,91
Materia Orgánica (pg.cel⁻¹ ±std)	10,85 ±1,16	16,14 ±1,13	16,29 ±1,47	21,93 ±1,92	23,45 ±2,38
Materia Orgánica (ng.rotífero⁻¹ ±std)	204,82a ±15,02	219,82b ±22,41	259,92c ±18,036	267,81d ±20,31	269,07e ±11,19
DensidadT₈ (Rotíferos.mL⁻¹ ± std)	189,00a ±8,00	326,00c ±24,06	236,00b ±8,19	338,0e ±11,79	334,0d ±18,23
DensidadT₈ (huevos.mL⁻¹)	11,00a ±1,10	115,00d ±4,06	76,00b ±8,19	102,00c ±1,79	106,0c ±10,28
Q_N celular (pg)	4,92 ±0,18	10,83 ±0,14	6,33 ±0,04	9,28 ±0,49	16,82 ±0,13
Q_C celular (pg)	33,16 ±1,03	129,99 ±1,71	81,64 ±0,88	71,85 ±3,66	97,67 ±1,10
RelaciónC:N(átomos)	5,75	10,28	11,05	6,64	4,98

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

Tabla 2

Absorción atómica de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y S^{2-} en concentraciones óptimas en *Brachionus plicatilis* alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso (cultivo semicontinuo) cultivadas con Algal Alto Rendimiento (AARTiso**) (modificado de Fábregas et al., 1984) y Algal Industrial® (**AITiso**) (Fábregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹**

Constituyentes <i>rAITiso4</i>	Absorción Atómica (ng.rotífero ⁻¹)	Constituyentes <i>rAARTiso4</i>	Absorción Atómica (ng.rotífero ⁻¹)
S(0)mM	1,19a ±0,18	S(0,1)mM	1,80b ±0,19
Ca(0)mM	1,52a ±0,24	Ca(10,0)mM	3,62b ±0,32
Mg(0)mM	0,66a ±0,02	Mg(10,0)mM	1,19b ±0,23
Fe(20,0)mM	0,12a ±0,01	Fe(20,0)mM	0,12a ±0,01
Absorción Atómica (pg.rotífero ⁻¹)		Absorción Atómica (pg.rotífero ⁻¹)	
Zn(1,0)mM	110,0a ±13,0	Zn(1,0)mM	160,0b ±14,6
Si(0)mM	45,0a ±2,0	Si(1,0)mM	150,0b ±11,0
Se(0)mM	9,0a ±0,6	Se(1,0)mM	17,0b ±1,0
Cu (0,1)mM	8,0a ±0,3	Cu (1,0)mM	11,0b ±0,9

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=5). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

Tabla 3

Absorción atómica de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y S^{2-} en concentraciones óptimas en *Brachionus plicatilis* alimentado con *Isochrysis galbana* var. T-iso (cultivo semicontinuo) cultivadas con Algal Incremento Concentración DHA (ADHA) (modificado de Fábregas et al., 1984) y Algal Industrial® (AITiso4) (Fábregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4, 8, 16 mg át. N/L y tasa de renovación 30%. día⁻¹

Constituyentes <i>rAITiso4</i>	Absorción Atómica (ng.rot ⁻¹)	Constituyentes <i>rADHA4</i>	Absorción Atómica (ng.rot ⁻¹)	Constituyentes <i>rADHA8</i>	Absorción Atómica (ng.rot ⁻¹)	Constituyentes <i>rADHA16</i>	Absorción Atómica (ng.rot ⁻¹)
S(0)mM	1,19a ±0,18	S(1,0)mM	2,86b ±0,24	S(1,0)mM	3,07c ±0,27	S(1,0)mM	3,33d ±0,19
Ca(0)mM	1,52a ±0,24	Ca(1,0)mM	2,10b ±0,24	Ca(1,0)mM	2,94c ±0,16	Ca(1,0)mM	3,04c ±0,25
Mg(0)mM	0,66a ±0,02	Mg(1,0)mM	1,29b ±0,14	Mg(1,0)mM	1,99c ±0,18	Mg(1,0)mM	2,38d ±0,26
Fe(20,0)mM	0,12a ±0,01	Fe(20,0)mM	0,12a ±0,01	Fe(20,0)mM	0,23b ±0,02	Fe(20,0)mM	0,32c ±0,02
Zn(1,0)mM	110,0a ±13,0	Zn(1,0)mM	112,0a ±9,0	Zn(1,0)mM	374,0b ±14,0	Zn(1,0)mM	419,0c ±26,0
Si(0)mM	45,0a ±2,0	Si(1,0)mM	144,0b ±9,0	Si(1,0)mM	578,0c ±22,0	Si(1,0)mM	600,0d ±46,0
Se(0)mM	9,0a ±0,6	Se(0,1)mM	16,0b ±1,4	Se(0,1)mM	24,0c ±2,0	Se(0,1)mM	36,0d ±2,4
Cu (0,1)mM	8,0a ±0,3	Cu (1,0)mM	14,6b ±1,5	Cu (1,0)mM	27,0c ±2,3	Cu (1,0)mM	36,0d ±3,0

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=5). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

Tabla 4. Composición de Ácidos Grasos *Brachionus plicatilis* (% del total A.G.), ácidos grasos x rotífero (A.G. ng.rotífero⁻¹) y lípidos totales x rotífero (ng.rotífero⁻¹) alimentado con *Isochrysis galbana* var. **T-iso** cultivada **AI(Algal Industrial4)**, **AAR(Algal Alto Rendimiento4)**, **ADHA(Algal Incremento DHA4,8,16mM)**.

Acido Graso	(rAARTiso4)			(rADHA4)			(rADHA8)			(rADHA16)		
	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	%A.G.	%A.G.	ng.rotífero ⁻¹	ng.rotífero ⁻¹
12:0	0.31±0.02	0.04±0.00	0.53±0.03	0.81±0.02	0.08±0.00	0.16±0.02	0.51±0.01	0.10±0.03	0.45±0.01	0.09±0.00	0.09±0.00	0.09±0.00
14:0	13.89±0.80	1.71±0.16	15.15±1.57	17.24±1.33	2.39±0.24	3.37±0.21	15.96±1.30	3.25±0.27	17.62±0.64	3.57±0.29	3.57±0.29	3.57±0.29
15:0	1.85±0.07	0.23±0.01	1.32±0.12	1.28±0.02	0.21±0.02	0.25±0.02	1.08±0.09	0.22±0.03	1.00±0.06	0.20±0.01	0.20±0.01	0.20±0.01
16:0	21.73±0.35	2.67±0.05	22.09±2.65	21.48±2.75	3.48±0.25	4.20±0.22	17.17±1.38	3.30±0.38	18.41±0.27	3.73±0.11	3.73±0.11	3.73±0.11
16:1(n-7)	9.38±0.10	1.15±0.10	8.41±0.10	7.60±0.71	1.32±0.13	1.50±0.13	7.01±0.29	1.42±0.01	8.01±0.17	1.62±0.04	1.62±0.04	1.62±0.04
16:2(n-6)	0.78±0.03	0.10±0.01	0.78±0.01	0.62±0.04	0.12±0.01	0.12±0.01	0.53±0.02	0.11±0.01	0.61±0.01	0.12±0.00	0.12±0.00	0.12±0.00
16:2(n-4)	0.71±0.02	0.09±0.00	0.69±0.08	0.61±0.01	0.11±0.01	0.12±0.01	0.47±0.03	0.10±0.01	0.46±0.04	0.09±0.02	0.09±0.02	0.09±0.02
18:0	4.45±0.30	0.55±0.03	4.78±0.29	4.51±0.38	0.75±0.01	0.89±0.02	4.09±0.38	0.83±0.01	3.74±0.30	0.76±0.06	0.76±0.06	0.76±0.06
18:1(n-9)	12.36±1.24	1.52±0.18	16.68±1.64	19.21±1.85	2.63±0.24	3.80±0.36	15.22±1.59	3.22±0.43	10.82±0.33	2.19±0.13	2.19±0.13	2.19±0.13
18:1(n-7)	2.67±0.15	0.33±0.01	1.88±0.13	1.71±0.19	0.30±0.03	0.34±0.02	2.22±0.17	0.45±0.03	2.14±0.13	0.43±0.04	0.43±0.04	0.43±0.04
18:2(n-6)	5.77±0.33	0.71±0.06	5.43±0.39	5.16±0.27	0.86±0.02	1.02±0.13	6.80±0.25	1.38±0.04	6.71±0.22	1.36±0.05	1.36±0.05	1.36±0.05
18:3(n-6)	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
18:3(n-3)	4.65±0.36	0.57±0.18	4.34±0.13	3.26±0.22	0.68±0.04	0.64±0.04	5.59±0.02	1.14±0.05	5.95±0.10	1.20±0.05	1.20±0.05	1.20±0.05
18:4(n-3)	3.44±0.29	0.42±0.05	3.64±0.24	3.57±0.43	0.58±0.01	0.71±0.01	5.27±0.02	1.07±0.05	6.13±0.34	1.24±0.09	1.24±0.09	1.24±0.09
20:0	0.18±0.02	0.02±0.00	0.33±0.02	0.13±0.02	0.05±0.00	0.03±0.01	0.19±0.06	0.04±0.01	0.23±0.02	0.05±0.00	0.05±0.00	0.05±0.00
20:1(n-9)	3.03±0.26	0.37±0.04	2.35±0.19	1.86±0.12	0.37±0.01	0.37±0.02	3.14±0.26	0.64±0.06	3.13±0.12	0.63±0.01	0.63±0.01	0.63±0.01
20:2(n-9)	0.14±0.02	0.02±0.00	0.09±0.00	0.10±0.01	0.01±0.00	0.02±0.00	0.14±0.00	0.03±0.00	0.12±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
20:3(n-5)	1.01±0.12	0.12±0.02	0.59±0.02	0.53±0.04	0.09±0.02	0.10±0.02	0.75±0.07	0.15±0.02	0.57±0.04	0.12±0.01	0.12±0.01	0.12±0.01
20:4(n-6)	4.99±0.38	0.61±0.06	3.92±0.10	3.98±0.26	0.62±0.02	0.79±0.01	4.32±0.30	1.08±0.07	3.27±0.14	1.21±0.06	1.21±0.06	1.21±0.06
20:4(n-3)	2.85±0.16	0.35±0.02	1.45±0.12	1.17±0.08	0.23±0.02	0.23±0.03	1.78±0.16	0.36±0.03	1.77±0.08	0.36±0.03	0.36±0.03	0.36±0.03
20:5(n-3)	0.57±0.03	0.06±0.00	0.66±0.01	0.40±0.02	0.10±0.01	0.08±0.02	0.54±0.04	0.11±0.02	0.68±0.01	0.14±0.01	0.14±0.01	0.14±0.01
22:0	0.18±0.02	0.02±0.00	0.20±0.01	0.15±0.01	0.03±0.00	0.03±0.02	0.13±0.02	0.03±0.00	0.07±0.01	0.07±0.01	0.07±0.01	0.07±0.01
22:1	0.48±0.06	0.06±0.00	0.28±0.01	0.24±0.02	0.04±0.00	0.05±0.00	0.22±0.02	0.04±0.01	0.29±0.02	0.06±0.00	0.06±0.00	0.06±0.00
22:5(n-3)	0.52±0.05	0.06±0.00	0.78±0.02	0.58±0.06	0.12±0.01	0.11±0.01	0.62±0.08	0.13±0.02	0.70±0.03	0.14±0.01	0.14±0.01	0.14±0.01
22:6(n-3)	4.09±0.36	0.52±0.04	5.38±0.06	4.04±0.03	0.70±0.02	0.82±0.04	5.25±0.09	1.07±0.01	4.42±0.12	0.89±0.02	0.89±0.02	0.89±0.02
Saturados	42.58±0.3c	5.24±0.22	44.40±3.8d	45.59±4.6e	6.99±0.18	8.93±0.23	40.13±3.9a	8.16±0.10	41.52±0.3b	8.41±0.44	8.41±0.44	8.41±0.44
Monounsaturados	27.91±0.7b	3.43±0.08	29.60±2.2d	30.63±2.9e	4.67±0.51	6.06±0.11	28.50±3.4c	5.77±0.52	24.39±0.3a	4.94±0.18	4.94±0.18	4.94±0.18
Poliinsaturados	29.51±0.5c	3.63±0.15	25.99±1.9b	23.79±1.7a	4.10±0.35	4.70±0.27	31.37±0.9d	6.37±0.40	34.09±0.4e	6.90±0.30	6.90±0.30	6.90±0.30
ω -3	15.59±0.39	1.92±0.04	14.95±1.10	12.22±1.03	2.37±0.14	2.42±0.39	16.74±0.63	3.40±0.26	18.95±0.37	3.84±0.17	3.84±0.17	3.84±0.17
ω -6	11.55±0.69	1.42±0.12	11.47±0.16	9.76±0.57	1.81±0.06	1.93±0.13	12.65±0.50	2.57±0.10	13.29±0.35	2.69±0.12	2.69±0.12	2.69±0.12
ω -3: ω -6	1.35±0.1c	1.35±0.12	1.30±0.1b	1.25±0.1a	1.30±0.19	1.25±0.06	1.32±0.1c	1.32±0.06	1.43±0.1d	1.43±0.06	1.43±0.06	1.43±0.06
DHA	4.19±0.3b	0.52±0.04	5.38±0.6d	4.04±0.3a	0.70±0.02	0.82±0.04	5.25±0.4d	1.07±0.01	4.42±0.1c	0.89±0.02	0.89±0.02	0.89±0.02
EPA	0.47±0.03	0.06±0.01	0.66±0.01	0.40±0.02	0.10±0.01	0.08±0.01	0.54±0.04	0.11±0.02	0.68±0.01	0.14±0.01	0.14±0.01	0.14±0.01
DHA:EPA	7.17±0.4b	7.17±0.36	8.15±0.2c	10.07±0.3e	8.15±0.20	10.01±0.35	9.72±0.4d	9.72±0.43	6.51±0.1a	6.51±0.12	6.51±0.12	6.51±0.12
EPA:DHA	0.11±0.01	0.11±0.01	0.12±0.01	0.10±0.01	0.12±0.01	0.10±0.01	0.10±0.01	0.10±0.01	0.15±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00
DHA:ARA	0.84±0.0a	±	1.37±0.1d	1.01±0.1b	±	±	1.21±0.1c	±	1.35±0.1d	±	±	±
Total A.G.	±	12.30±0.4a	±	15.76±0.5b	±	19.69±1.5c	±	20.31±0.9d	±	20.24±0.9d	±	20.24±0.9d
Total Lípidos	±	49.12±2.44	±	52.16±3.71	±	66.72±4.07	±	72.50±4.57	±	70.27±3.50	±	70.27±3.50

A.G. ácido graso, DHA, docosahexaenoico. Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa (p<0.05).

Tabla 5

Cultivo de *Artemia franciscana* alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso con Algal de Alto Rendimiento (AAR) y Algal de Incremento de la Cantidad de DHA (ADHA) (cultivo semicontinuo) (modificado de Fabregas et al., 1984).

Concentración de nutrientes 4, 8, 16 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹

	aAITiso4	aAARTiso4	aADHA4	aADHA8	aADHA16
Densidad celular (10⁶ cél.mL⁻¹ std)	51,85 ±6,59	94,72 ±4,31	91,85 ±8,30	107,55 ±10,10	57,08 ±4,74
Productividad (10⁹ céls.L⁻¹.día⁻¹)	15,55	28,42	27,55	32,26	17,12
F.O. celular					
% proteína en F.O.	35,68	34,02	23,96	39,13	48,08
% carboh. en F.O.	27,44	37,57	46,76	23,75	15,14
% lípidos en F.O.	36,88	28,41	29,28	37,11	36,76
F.O. Artemia					
% proteína en F.O.	55,69	54,52	54,56	54,22	59,54
% carboh. en F.O.	17,21	18,25	17,80	18,39	14,09
% lípidos en F.O.	27,10	27,22	27,64	27,39	26,37
Proteínas (pg.célula⁻¹ ± std)	3,87 ±0,40	5,50 ±0,14	3,90 ±0,20	5,75 ±0,23	11,28 ±1,15
Carbohidratos (pg.célula⁻¹ ± std)	2,98 ±0,26	6,07 ±0,41	7,62 ±0,71	5,49 ±0,36	3,55 ±0,34
Lípidos (pg.célula⁻¹ ± std)	4,00 ±0,24	4,59 ±0,57	4,77 ±0,44	6,45 ±0,22	8,62 ±0,79
Peso orgánico pg.cel⁻¹	10,85	16,16	16,29	17,69	23,45
Proteínas (µg.artemia⁻¹ ± std)	84,92a ±3,92	104,95c ±8,12	92,04b ±5,98	105,30c ±9,18	134,05d ±11,54
Carbohidratos (µg.artemia⁻¹ ± std)	26,24a ±3,13	35,13de ±3,78	30,02b ±2,78	35,71e ±3,02	31,72c ±1,81
Lípidos (µg.artemia⁻¹ ± std)	41,33a ±1,91	52,39c ±2,40	46,62b ±2,98	53,20c ±1,94	59,37d ±2,34
Peso orgánico (µg.artemia⁻¹)	152,49	192,47	168,68	194,21	225,14
Valor calórico (10⁻⁷ J.célula⁻¹)	3,02	4,16	4,11	4,13	6,73
Valor calórico (10⁻⁶ J.artemia⁻¹)	4,12a	5,19c	4,56b	5,24c	6,10d
Peso seco (µg.mL⁻¹ ±std)	1275,53 ±126,44	2499,47 ±242,72	2642,47 ±315,87	3478,00 ±162,89	2498,67 ±31,86
Peso seco (pg.cel⁻¹ ±std)	12,96 ±1,53	19,63 ±1,34	19,84 ±1,42	21,93 ±2,06	23,45 ±2,28
Peso seco (µg.artemia⁻¹ ±std)	161,49a ±13,93	204,23c ±22,76	178,20b ±15,91	205,69c ±16,63	238,51d ±17,04
Cenizas (pg.cel⁻¹ ±std)	2,11 ±0,15	3,47 ±0,26	3,55 ±0,39	4,24 ±0,38	5,56 ±0,32
Cenizas (µg.artemia⁻¹ ±std)	8,99a ±0,72	11,74c ±1,72	10,12b ±1,27	11,48c ±1,54	13,37d ±1,62
Materia Orgánica (pg.cel⁻¹ ±std)	10,85 ±1,16	16,14 ±1,13	16,29 ±1,47	21,93 ±1,92	35,69 ±2,38
Materia Orgánica (µg.artemia⁻¹ ±std)	152,49a ±11,89	192,49c ±13,04	168,68b ±12,64	194,21c ±14,10	225,14d ±17,48
Supervivencia (%± std)	67,0a ±5,78	82,0c ±7,9	73,0b ±7,81	85,0d ±6,9	84,0d ±5,9
Longitud Total Artemia (mm.artemia⁻¹)	5,44a ±0,39	7,71c ±0,41	6,53b ±0,46	8,64d ±0,36	8,67d ±0,56
Q_N celular (pg)	4,92 ±0,18	10,83 ±0,14	6,33 ±0,40	9,28 ±0,49	16,82 ±0,13
Q_C celular (pg)	33,16 ±1,03	129,99 ±1,71	81,64 ±0,88	71,85 ±3,66	97,67 ±0,88
RelaciónC:N(átomos)	5,78	10,28	11,05	6,64	4,98

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$)

Tabla 6

Absorción atómica de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y S^{2-} en concentraciones óptimas en *Artemia franciscana* alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso (cultivo semicontinuo) cultivadas con Algal Alto Rendimiento (AARTiso**) (modificado de Fábregas et al., 1984) y Algal Industrial® (**AITiso**) (Fábregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4 mg át. N/L y tasa de renovación 30%.día⁻¹**

Constituyentes <i>aAITiso4</i>	Absorción Atómica ($\mu g.artemia^{-1}$)	Constituyentes <i>aAARTiso4</i>	Absorción Atómica ($\mu g.artemia^{-1}$)
S(0)mM	1,25a ±0,12	S(0,1)mM	1,99b ±0,16
Ca(0)mM	0,65a ±0,05	Ca(10,0)mM	1,31b ±0,15
Mg(0)mM	0,36a ±0,01	Mg(10,0)mM	1,11b ±0,12
Zn(1,0)mM	0,38a ±0,03	Zn(1,0)mM	0,45b ±0,03
Absorción Atómica ($ng.artemia^{-1}$)		Absorción Atómica ($ng.artemia^{-1}$)	
Fe(20,0)mM	69,0a ±5,0	Fe(20,0)mM	81,0b ±9,0
Si(0)mM	33,0a ±2,0	Si(1,0)mM	240,0b ±12,0
Se(0)mM	1,4a ±0,1	Se(1,0)mM	23,0b ±2,0
Cu (0,1)mM	3,1a ±0,2	Cu (1,0)mM	33,0b ±3,0

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=5). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0,05$).

Tabla 7

Absorción atómica de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y S^{2-} en concentraciones óptimas en *Artemia franciscana* alimentada con de *Isochrysis galbana* var. T-iso (cultivo semicontinuo) cultivadas con Algal Incremento Concentración DHA (ADHA) (modificado de Fábregas et al., 1984) y Algal Industrial® (AITiso4) (Fábregas et al., 1984). Concentración de nutrientes 4, 8, 16 mg át. N/L y tasa de renovación 30%. día⁻¹

Constituyentes <i>aAITiso4</i>	Absorción Atómica ($\mu g \cdot art^{-1}$)	Constituyentes <i>aADHA4</i>	Absorción Atómica ($\mu g \cdot art^{-1}$)	Constituyentes <i>aADHA8</i>	Absorción Atómica ($\mu g \cdot art^{-1}$)	Constituyentes <i>aADHA16</i>	Absorción Atómica ($\mu g \cdot art^{-1}$)
S(0)mM	1,25a ±0,12	S(1,0)mM	2,19b ±0,17	S(1,0)mM	2,71c ±0,17	S(1,0)mM	2,99d ±0,19
Ca(0)mM	0,65a ±0,05	Ca(1,0)mM	1,44b ±0,14	Ca(1,0)mM	2,15c ±0,17	Ca(1,0)mM	2,93d ±0,29
Mg(0)mM	0,36a ±0,01	Mg(1,0)mM	1,18b ±0,14	Mg(1,0)mM	1,99c ±0,14	Mg(1,0)mM	2,27d ±0,14
Fe(20,0)mM	Absorción Atómica ($ng \cdot art^{-1}$)	Fe(20,0)mM	Absorción Atómica ($ng \cdot art^{-1}$)	Fe(20,0)mM	Absorción Atómica ($ng \cdot art^{-1}$)	Fe(20,0)mM	Absorción Atómica ($ng \cdot art^{-1}$)
	69,0a ±5,0		91,0b ±4,0		158,0c ±14,0		208,0d ±25,0
Zn(1,0)mM	38,0a ±3,0	Zn(1,0)mM	68,0b ±2,0	Zn(1,0)mM	107,0c ±13,0	Zn(1,0)mM	134,0d ±14,0
Si(0)mM	33,0a ±2,0	Si(1,0)mM	177,0b ±13,0	Si(1,0)mM	340,0c ±28,0	Si(1,0)mM	485,0d ±38,0
Se(0)mM	1,4a ±0,1	Se(0,1)mM	25,0b ±3,0	Se(0,1)mM	60,0c ±4,0	Se(0,1)mM	85,0d ±7,0
Cu (0,1)mM	3,1a ±0,2	Cu (1,0)mM	9,2b ±0,8	Cu (1,0)mM	47,0c ±3,0	Cu (1,0)mM	66,0d ±5,01

Los valores aquí presentes son la media ± SD (n=5). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

Tabla 8. Composición de Ácidos Grasos *Artemia franciscana* (% del total A.G.), ácidos grasos x Artemia (A.G. $\mu\text{g. artemia}^{-1}$) y lípidos totales x Artemia ($\mu\text{g. artemia}^{-1}$) alimentada con *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada Algal Industrial(AI4), Algal Alto Rendimiento(AAR4), Algal Incremento DHA(ADHA4,8,16).

Acido Graso	(aAITiso4)			(aADHA4)			(aADHA8)			(aADHA16)		
	%A.G.	$\mu\text{g. artemia}^{-1}$	%A.G.	%A.G.	$\mu\text{g. artemia}^{-1}$	%A.G.	%A.G.	$\mu\text{g. artemia}^{-1}$	%A.G.	%A.G.	$\mu\text{g. artemia}^{-1}$	$\mu\text{g. artemia}^{-1}$
12:0	0.13±0.02	0.02±0.00	0.10±0.03	0.11±0.02	0.01±0.00	0.13±0.04	0.13±0.04	0.01±0.00	0.20±0.02	0.20±0.02	0.02±0.00	0.02±0.00
14:0	8.42±0.55	1.03±0.14	8.53±0.17	11.75±0.54	1.38±0.13	11.41±1.64	11.41±1.64	1.10±0.12	8.44±0.59	8.44±0.59	0.70±0.06	0.70±0.06
15:0	0.36±0.02	0.04±0.00	0.37±0.02	0.52±0.03	0.06±0.00	0.41±0.04	0.41±0.04	0.04±0.00	0.61±0.03	0.61±0.03	0.05±0.00	0.05±0.00
16:0	17.43±1.89	2.13±0.16	17.80±1.05	17.85±0.28	1.80±0.19	22.30±1.25	22.30±1.25	2.13±0.27	20.25±1.47	20.25±1.47	1.68±0.15	1.68±0.15
16:1(n-7)	5.41±0.60	0.66±0.05	6.05±0.26	6.18±0.42	0.61±0.08	6.55±0.49	6.55±0.49	0.63±0.01	5.65±0.10	5.65±0.10	0.47±0.02	0.47±0.02
16:2(n-6)	0.35±0.03	0.04±0.00	0.30±0.03	0.31±0.01	0.03±0.00	0.39±0.03	0.39±0.03	0.04±0.00	0.38±0.03	0.38±0.03	0.03±0.00	0.03±0.00
16:2(n-4)	0.26±0.04	0.03±0.01	0.25±0.02	0.24±0.02	0.03±0.00	0.30±0.03	0.30±0.03	0.03±0.00	0.24±0.03	0.24±0.03	0.02±0.00	0.02±0.00
18:0	7.55±0.89	0.90±0.03	10.35±0.44	10.35±0.18	1.05±0.14	9.07±0.21	9.07±0.21	0.87±0.02	7.83±0.31	7.83±0.31	0.65±0.02	0.65±0.02
18:1(n-9)	28.20±2.88	3.42±0.09	31.77±0.58	30.69±1.74	3.59±0.31	27.82±1.58	27.82±1.58	2.94±0.13	29.44±2.88	29.44±2.88	2.43±0.19	2.43±0.19
18:1(n-7)	7.10±0.10	0.86±0.08	6.47±0.50	5.90±0.57	0.66±0.01	6.03±0.45	6.03±0.45	0.57±0.02	8.31±0.14	8.31±0.14	0.69±0.08	0.69±0.08
18:2(n-6)	3.56±0.28	0.43±0.04	3.93±0.35	5.73±0.05	0.40±0.03	6.21±0.22	6.21±0.22	0.31±0.02	4.23±0.17	4.23±0.17	0.35±0.01	0.35±0.01
18:3(n-6)	0.19±0.05	0.02±0.00	0.23±0.04	0.12±0.00	0.02±0.00	0.16±0.01	0.16±0.01	0.02±0.00	0.34±0.02	0.34±0.02	0.03±0.00	0.03±0.00
18:3(n-3)	12.62±1.69	1.76±0.24	3.68±0.23	2.67±0.26	0.37±0.03	2.70±0.11	2.70±0.11	0.26±0.01	4.13±0.12	4.13±0.12	0.34±0.03	0.34±0.03
18:4(n-3)	3.81±0.29	0.46±0.03	4.65±0.37	3.19±0.28	0.47±0.01	3.01±0.35	3.01±0.35	0.29±0.03	4.09±0.28	4.09±0.28	0.34±0.03	0.34±0.03
20:0	0.14±0.01	0.02±0.00	0.10±0.01	0.11±0.01	0.01±0.00	0.10±0.01	0.10±0.01	0.01±0.00	0.14±0.01	0.14±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00
20:1(n-9)	0.21±0.04	0.03±0.00	0.20±0.02	0.20±0.02	0.02±0.00	0.12±0.01	0.12±0.01	0.01±0.00	0.25±0.03	0.25±0.03	0.02±0.00	0.02±0.00
20:2(n-9)	0.11±0.01	0.01±0.00	0.11±0.01	0.09±0.00	0.01±0.00	0.08±0.00	0.08±0.00	0.01±0.00	0.14±0.01	0.14±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00
20:3(n-5)	0.92±0.02	0.11±0.02	0.91±0.07	0.67±0.02	0.09±0.02	0.61±0.02	0.61±0.02	0.06±0.00	1.16±0.07	1.16±0.07	0.10±0.00	0.10±0.00
20:4(n-6)	2.51±0.18	0.32±0.05	2.69±0.16	1.98±0.02	0.27±0.03	1.54±0.02	1.54±0.02	0.14±0.01	2.72±0.21	2.72±0.21	0.23±0.01	0.23±0.01
20:4(n-3)	0.23±0.05	0.03±0.01	0.26±0.02	0.17±0.13	0.03±0.01	0.16±0.16	0.16±0.16	0.02±0.00	0.24±0.03	0.24±0.03	0.02±0.00	0.02±0.00
20:5(n-3)	0.36±0.04	0.04±0.00	0.39±0.05	0.32±0.04	0.04±0.00	0.26±0.02	0.26±0.02	0.02±0.00	0.52±0.01	0.52±0.01	0.04±0.00	0.04±0.00
22:0	0.15±0.02	0.02±0.00	0.11±0.01	0.19±0.02	0.01±0.00	0.12±0.01	0.12±0.01	0.01±0.00	0.16±0.01	0.16±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00
22:1	0.16±0.02	0.02±0.00	0.16±0.02	0.16±0.02	0.02±0.00	0.20±0.03	0.20±0.03	0.02±0.00	0.20±0.02	0.20±0.02	0.02±0.00	0.02±0.00
22:5	0.10±0.02	0.01±0.00	0.10±0.01	0.10±0.02	0.01±0.00	0.05±0.00	0.05±0.00	0.00±0.00	0.09±0.01	0.09±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00
22:6(n-3)	0.48±0.03	0.06±0.00	0.61±0.03	0.63±0.14	0.07±0.00	0.54±0.05	0.54±0.05	0.05±0.00	0.44±0.01	0.44±0.01	0.04±0.00	0.04±0.00
Saturados	34.17±2.8a	4.15±0.11	37.36±1.3b	40.88±0.5c	5.14±0.30	43.52±2.9d	43.52±2.9d	4.18±0.36	37.64±4.4b	37.64±4.4b	3.12±0.42	3.12±0.42
Monounsaturados	41.08±4.5a	4.99±0.20	44.65±0.7c	43.08±1.8b	5.05±0.42	40.72±1.4a	40.72±1.4a	4.17±0.29	43.85±3.9b	43.85±3.9b	3.63±0.25	3.63±0.25
Poliinsaturados	24.87±1.3c	3.23±0.20	18.09±1.3b	16.15±1.5a	1.85±0.14	15.89±1.7a	15.89±1.7a	1.22±0.12	18.72±0.3b	18.72±0.3b	1.55±0.10	1.55±0.10
ω -3	9.53±0.82	1.07±0.12	9.56±0.67	6.92±0.19	0.98±0.02	7.42±0.73	7.42±0.73	0.62±0.02	9.42±0.03	9.42±0.03	0.78±0.02	0.78±0.02
ω -6	5.99±0.50	0.71±0.03	7.15±0.52	5.13±0.17	0.73±0.01	5.30±0.52	5.30±0.52	0.50±0.03	7.67±0.34	7.67±0.34	0.63±0.02	0.63±0.02
ω -3:ω -6	1.59±0.2d	1.59±0.25	1.34±0.1b	1.34±0.1b	1.34±0.02	1.40±0.1c	1.40±0.1c	1.40±0.12	1.23±0.1a	1.23±0.1a	1.23±0.06	1.23±0.06
DHA	0.48±0.0a	0.06±0.00	0.61±0.0c	0.63±0.0c	0.07±0.00	0.54±0.0b	0.54±0.0b	0.05±0.05	0.44±0.0a	0.44±0.0a	0.04±0.00	0.04±0.00
DHA:EPA	1.34±0.1b	1.34±0.09	1.56±0.0c	1.96±0.1d	1.56±0.05	2.08±0.1d	2.08±0.1d	2.08±0.15	0.88±0.0a	0.88±0.0a	0.88±0.02	0.88±0.02
DHA:ARA	0.19±0.02	±	0.23±0.02	0.32±0.03	±	0.35±0.02	0.35±0.02	±	0.17±0.01	0.17±0.01	±	±
Total A.G.	±	12.35±1.1e	±	10.16±1.1c	±	11.71±0.6d	11.71±0.6d	±	9.56±0.8b	9.56±0.8b	±	8.28±0.2a
Total Lípidos	±	41.33±1.91	±	52.39±2.40	±	46.62±2.98	46.62±2.98	±	53.20±1.94	53.20±1.94	±	59.37±2.34

A.G. ácido graso, DHA, docosahexaenoico. Los valores aquí presentes son la media \pm SD (n=3). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia significativa ($p<0.05$).

Capítulo 10

Evaluación de la **Capacidad Antioxidante** (AA) y **Contenido Polifenólico Total** (CPT), en las microalgas ***Phaeodactylum tricornutum*** e ***Isochrysis galbana*** var. **T-iso**, manipuladas bioquímicamente con los medios de cultivo **Algal Alto Rendimiento (AARPt, AARTISO)** y **Algal Incremento Concentración EPA y DHA**.

Introducción

El daño oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos puede desencadenar varias enfermedades crónicas, como enfermedades coronarias, artero-esclerosis, cáncer y envejecimiento celular. Estudios epidemiológicos han demostrado una asociación inversa entre la ingesta de frutos y hortalizas y la mortalidad por edad relacionados con enfermedades coronarias y cáncer que pueden atribuirse a actividad antioxidante. Durante las últimas décadas, ha habido un creciente interés por sustituir los antioxidantes sintéticos, como el BHA y BHT, con antioxidantes naturales principalmente en alimentos que contienen lípidos, ya que resultan ser tóxicos y cancerígenos (Amarowicz *et al.*, 2000). Por lo tanto, es importante encontrar nuevas fuentes seguras y baratas de antioxidantes de origen natural (Duan *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007), como en las algas marinas, sin embargo poca atención se ha dado al estudio de estas propiedades (Matsukawa *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1998).

La biomasa algal y compuestos derivados de algas poseen una muy amplia gama de aplicaciones potenciales, desde la alimentación animal y de acuicultura a la nutrición humana así como su importancia biotecnológica y biomédica para la producción de biomoléculas o compuestos activos para la salud; tales como actividad hemaglutinante y antioxidante (Blunt *et al.*, 2005; Ronsón-Paulín *et al.*, 2006; Anagnostopoulou *et al.*, 2006; Guzmán-Murillo *et al.*, 2007). Algunas algas son consideradas como fuentes ricas de antioxidantes naturales (Huang and Wang, 2004; Rocha de Souza *et al.*, 2007). A pesar de haber recibido bastante atención las macroalgas como posibles antioxidantes naturales (Kuda *et al.*, 2005; Duan *et al.*, 2006; Nahas *et al.*, 2007), ha habido muy poca información sobre la actividad antioxidante de las microalgas (Tannin-Spitz *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Guzmán-Murillo *et al.*, 2007).

Las microalgas representan un recurso natural de antioxidantes sin explorar y explotar, debido a su enorme diversidad biológica, incluso superando el de las plantas superiores. Sin embargo, no todos los grupos de microalgas pueden ser utilizados como fuentes naturales de antioxidantes, debido a la gran variedad de compuestos y subproductos que forman, la tasa de crecimiento o rendimiento total, la facilidad de cultivo, y / o otros factores. Informes sobre la actividad antioxidante de las microalgas son limitados, especialmente en lo relativo a la relación entre su contenido de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante (Li *et al.*, 2007).

Las microalgas pueden servir como una continua y confiable fuente de productos naturales, incluidos los antioxidantes y compuestos fenólicos, ya que pueden ser cultivadas en biorreactores a mediana y gran escala (Chen, 1996). Además, las cualidades de las células microalgales pueden ser controladas y modificadas biotecnológicamente, a fin de que no contengan herbicidas y plaguicidas, o cualquier otra sustancia tóxica, mediante el uso de los medios de crecimiento con nutrientes adecuados en calidad y cantidad para potenciar

mayores rendimientos y mejorar su calidad en ácidos grasos (capítulos 6 y 7). El valor de las microalgas como una fuente de antioxidantes naturales es aún mayor por la relativa facilidad de purificación de sus compuestos (Li *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005).

Las plantas contienen un muy diverso grupo de compuestos fenólicos, incluidos los simples, ácidos, antocianinas, derivados del ácido hidroxycinámico y flavonoides. Todas las clases fenólicas poseen los requisitos estructurales de los radicales libres como potenciales antioxidantes de los alimentos (Bandoni *et al.* and Murkovic, 2002). Sin embargo estos antioxidantes naturales no solo están limitados a fuentes terrestres. Organismos marinos como las macroalgas y microalgas han demostrado ser una rica fuente de metabolitos secundarios de novedosa estructura y biológicamente activos como los antioxidantes y hepatoprotectores. Por ejemplo clorofilas, ficocianina, fucoxantina, carotenoides, derivados del tocoferol como la vitamina E así como isoprenoides, polisacáridos sulfatados y florotaninos (Usov *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2002; Takamatsu *et al.*, 2003, Benedetti *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2004; Durmaz *et al.*, 2007).

Diseño experimental

Reactivos y materiales: se empleó DPPH (2,2-difenil-1-picridazilo) en disolución con metanol (MeOH) 6×10^{-5} M (4°C), reactivo de Folin-Ciocalteu, ácido gálico, carbonato sódico (7,5%). Todos los reactivos utilizados en la experimentación fueron grado analítico obtenido en la casa comercial Sigma-Aldrich (Alemania).

Las microalgas manipuladas bioquímicamente se evaluaron por primera vez para su actividad antioxidante. El presente estudio utilizó las microalgas *Isochrysis galbana* var. T-iso manipulada bioquímicamente con nomenclaturas **AITISO4=ALGAL**, **AARTISO4**, **ADHA4**, **ADHA8**, **ADHA16** y *Phaeodactylum tricornutum* con nomenclaturas **AIPt4=ALGAL**, **AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8**, **AEPA16**. Las microalgas fueron cultivadas en régimen discontinuo y semicontinuo ($n=3$) en una cámara isotérmica, centrifugadas y liofilizadas (figura 1).

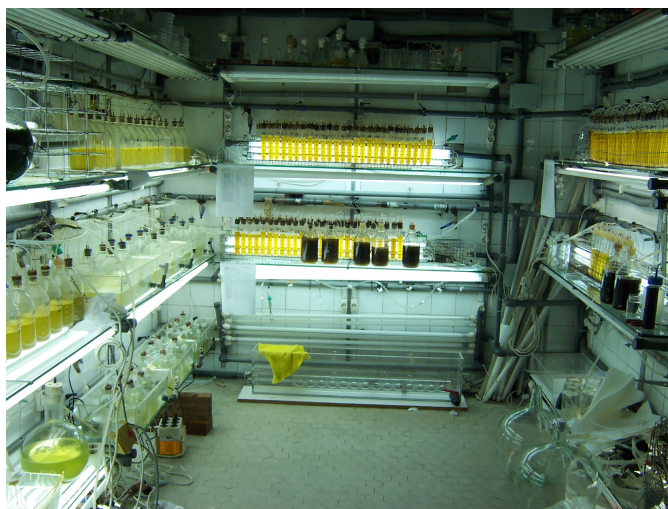


Figura 1. Manipulación bioquímica de *Isochrysis galbana* var. T-iso y *Phaeodactylum tricornutum*, con diferentes formulaciones de cultivo.

Preparación de muestras: las muestras liofilizadas se trituraron en un mortero. Se pesaron 30 mg los cuales se disolvieron en 1 mL de MeOH⁻. A continuación se sometieron a un baño ultrasónico (4°C) durante 45 min. Se centrifugaron a 4500g por 10 min., repitiéndose el procedimiento anterior una vez más. Los extractos se almacenaron a -80°C.

Evaluación de la Capacidad Antioxidante (Actividad Antirradical (A.A.)) con DPPH: la Capacidad Antioxidante de los extractos fue evaluada empleando un espectrofotómetro Jasco V-530 (Jasco Corporation Tokio Japón) por medio del método de DPPH (2,2-difenil-1-picridazilo) en disolución con MeOH⁻ 6x10⁻⁵ M (Brand-Williams *et al.*, 1995). En una cubeta de cuarzo se colocaron 980 µL de disolución de DHPH en fresco más 20 µL del extracto microalgal se mezcló y se midió la absorbancia a 515 nm hasta estabilización de la reacción a temperatura ambiente, utilizándose como blanco de reactivos metanol. Asimismo, una alícuota de DPPH se empleo como control. Los resultados son expresados como % de Inhibición del radical DPPH mg.mL⁻¹ de peso seco liofilizado de microalga y calculado como la media ± desviación estándar (SD) (*n* = 3). El % de Inhibición por el radical DPPH fue calculado empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = [1 - (A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco muestra}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

Donde **A_{control}** es la absorbencia del control (DPPH sin muestra), **A_{muestra}** es la absorbencia del DPPH mas la muestra, y **A_{blanco muestra}** es la absorbencia solo de la muestra (muestra sin DPPH).

Determinación del Contenido Polifenólico Total (CPT): el Contenido Polifenólico Total (CPT) fue estimado por el ensayo Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965). Se utilizaron 500 µL de cada extracto adicionándole 2,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu diluido (1:10). Después de 8 minutos, se añadieron 2,0 mL de carbonato sódico (7,5%) se vorteoó y se esperó 1 hora a que se completara la reacción a temperatura ambiente, midiéndose la absorbencia a 765 nm. Acido gálico (0-500 mg/L) fue empleado como estándar para elaborar una curva de calibración. Los resultados son expresados como equivalentes de ácido gálico EAG.g⁻¹ de peso seco liofilizado de microalga, calculándose la media ± (SD) (*n* = 3).

Resultados y discusión.

Actividad Antioxidante (AA) de *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. T-iso. En la tabla 1 se presenta la Actividad Antioxidante (**AA**) para las microalgas *Isochrysis galbana* var. T-iso manipuladas bioquímicamente con nomenclaturas **AITISO4=ALGAL**, **AARTISO4**, **ADHA4**, **ADHA8**, **ADHA16** y *Phaeodactylum tricornutum* con nomenclaturas **AIPt4=ALGAL**, **AARpt4**, **AEPA4**, **AEPA8**, **AEPA16**. Las microalgas analizadas poseen una muy diversa actividad antioxidante en torno a 5,0-81,0% (Inhibición radical DPPH mg.mL⁻¹) para las variedades de *Phaeodactylum tricornutum*, existiendo diferencias altamente significativas (*p*=0,001) entre las condiciones de cultivo (*p*<0,05)

excepto entre **AIPT4=ALGAL** y **AARPt4** (figura 2a); mientras que para las variedades de *Isochrysis galbana* var. T-iso estuvo entre 21-59% (Inhibición radical DPPH mg.mL⁻¹) existiendo de igual modo diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre ellas ($p<0,05$), ver figura 2b.

No es de sorprenderse que estos protocistas algales sean tan disímiles fisiológicamente en virtud de generar bioquímicamente diferentes biopolímeros aunado a la diversidad bioquímica que generaron en ellas las formulaciones de cultivo probadas (capítulos 6 y 7), tomando como base de estandarización el medio de cultivo "ALGAL" (Fábregas *et al.*,1984); es por lo cual que fue tan heterogénea su actividad antioxidante, de modo que las condiciones **AIPT4=ALGAL** y **AITISO4=ALGAL** mostraron un 5 y 37% de inhibición respectivamente. En tanto que los tratamientos **AARPt4** y **AARTISO4** revelaron un 5,8 y 53% de inhibición comparativamente. Finalmente los medios de cultivo **AEPA** y **ADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) indicaron un incremento del % de inhibición del radical DPPH mg.mL⁻¹ en torno a un 11-81% y un 21-59% correspondientemente; los cuales indicaron un coeficiente de correlación r^2 de 0,76 y 0,94 con ajuste a una tendencia lineal positiva (figura 3a y b).

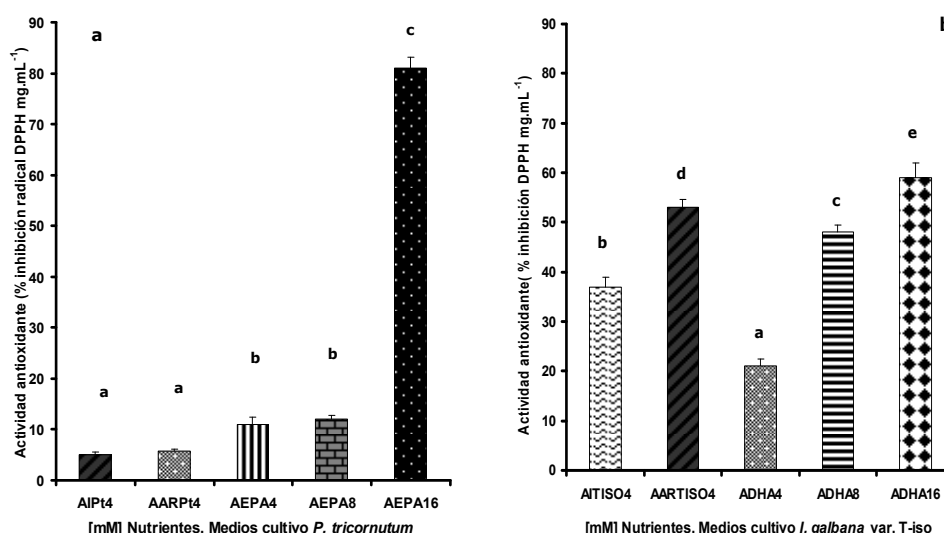


Figura 2. Actividad antioxidante (% inhibición DPPH mg.mL⁻¹), **(a)** *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes formulaciones de cultivo, **(b)** *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes formulaciones de cultivo. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

Los compuestos antioxidantes de las microalgas pueden ser de muy diferente polaridad; en el presente estudio solo se evaluó la extracción con metanol (tabla 1) no hallando registros hasta el momento donde hagan mención de **AA** para las especies aquí estudiadas, ni bajo condiciones de manipulación bioquímica. Diversos autores han reportado **AA** para otro tipo de microalgas tanto de agua marina como dulce con extractos en *n*-hexano, etylacetato, agua, etanol, etanol-éter (Lei *et al.*,2006; Li *et al.*,2007; Guzmán-Murillo *et al.*,2007); en las cuales aun con la oscilación de valores de **AA** respecto a su polaridad, son resultados que se encuentran muy por debajo de los descritos en las especies aquí descritas (tabla 2). Tannin-Spitz *et al.*,2005 evaluaron la **AA** en los polisacáridos de

Porphyridium sp encontrando un % de inhibición del ácido tiobarbiturico entre un 45 y 87% cuando empleo de 2 a 10 mg.mL⁻¹ de microalga liofilizada. Huang *et al.*, 2007 enriqueciendo con selenio a *Spirulina platensis* determina la **AA** en diversas fracciones incluidas ficocianina, polimeros de ficocianina unida a selenio describiendo % de inhibición en torno a 17,5-38,0% empleando 20g de material liofilizado. Por otra parte Hu *et al.*, 2008 determinando la **AA** en extractos de diversos carotenoides en *Dunaliella salina* obtiene % de inhibición de 67,32-77,37% empleando 40mg.mL⁻¹ de biomasa para su determinación.

Por otra parte autores como Duan *et al.*, 2006; Rocha de Souza *et al.*, 2007; Nahas *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007 han mencionado sobre la **AA** en varias macroalgas con extractos en metanol, etil-acetato, éter, *n*-butanol, diclorometano, *n*-hexano así como mezclas de solventes como metanol-cloroformo, metanol-diclorometano y etanol-éter obteniendo valores de **AA** entre 1,0 y 110,3 % inhibición del radical DPPH, oscilación dentro de la cual se encuentran los resultados obtenidos en las microalgas del presente estudio (tabla 3). Por otra parte Zubia *et al.*, 2007, determinando la **AA** en 17 macroalgas de la división Chlorophyta, 8 de la división Phaeophyta y 23 de la división Rhodophyta, describe valores de 1,44-51,48%, 0,32-34,88% y 2,84-77,71% (inhibición radical DPPH mg.mL⁻¹) respectivamente, resultados que están muy cercanos a los obtenidos con microalgas en las condiciones **AEPA16**(81%), **AARTISO4**(53%), **ADHA8**(48%) y **ADHA16**(59%).

Es en base a lo anteriormente reportado y no existiendo información previa en cuanto a la **AA** de los extractos de las dos microalgas aquí estudiadas así como de sus variedades producto de su manipulación bioquímica; es que este estudio proporciona valiosa información sobre su alta capacidad antioxidante. Estas microalgas cultivadas con diferentes formulaciones pueden ser catalogadas como potenciales fuentes ricas en antioxidantes naturales preventivos en la cadena trófica así como prevenir el deterioro oxidativo de alimentos en acuicultura.

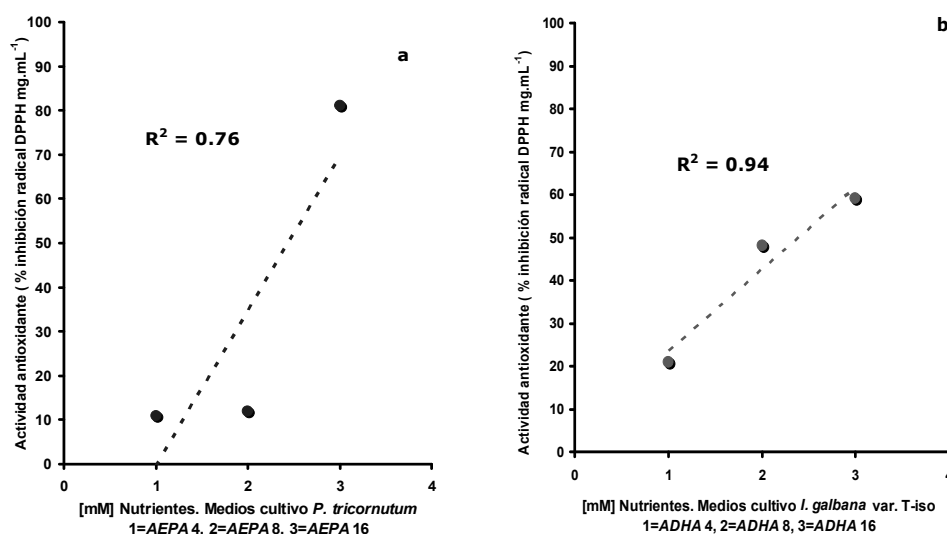


Figura 3. Coeficientes de correlación actividad antioxidante (% inhibición DPPH mg.mL⁻¹), **(a)** *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con **AEPA**4, 8 y 16mM, **(b)** *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con **ADHA**4, 8 y 16mM.

Contenido Polifenólico Total (CPT) en *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. T-iso. Compuestos fenólicos, como flavonoides, ácidos fenólicos y taninos se consideran los principales contribuyentes a la capacidad antioxidante de las plantas superiores. Estos antioxidantes también poseen diversas actividades biológicas, tales como anti-inflamatorias, anti-artereoscleróticas y anti-cancerígenos (Li *et al.*, 2007) ; además de ser un importante factor relacionado con la supervivencia al promover respuestas inmunoregulatoras mediante mecanismos de defensa a nivel de pared celular al quelatar los ROS en algunas fases del desarrollo larval de peces, crustáceos y evitar la peroxidación de los lípidos, proteínas y DNA corporales. Estas actividades están relacionadas con actividad antioxidante preventiva (Song and Yen, 2002).

El contenido polifenólico total (**CPT**) de la fracción en metanol, de las microalgas *Isochrysis galbana* var. T-iso con las formulaciones de cultivo **AITISO4=ALGAL**, **AARTISO4**, **ADHA4**, **ADHA8**, **ADHA16** y *Phaeodactylum tricornutum* con los medios de cultivo **AIPT4=ALGAL**, **AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8**, **AEPA16** también fue evaluado, utilizando el método de Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965). La variación del **CPT** se observa en la *tabla 4*.

El **CPT** (mg EAG.g⁻¹ microalga) para *Isochrysis galbana* var. T-iso mostró los siguientes valores: 2,30 (**AITISO4=ALGAL**), 2,50 (**AARTISO4**), 1,80 (**ADHA4**), 2,50 (**ADHA8**) y 2,50 (**ADHA16**) indicándonos la existencia de diferencias significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo ($p<0,05$) excepto entre **AARTISO4**, **ADHA8** y **ADHA16** (*figura 4a*). Por lo que respecta a *Phaeodactylum tricornutum* se obtuvo: 2,40 (**AIPT4=ALGAL**), 2,50 (**AARPt4**), 2,60 (**ADHA4**), 3,10 (**ADHA8**) y 5,20 (**ADHA16**) existiendo diferencias significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo ($p<0,05$) excepto entre **AIPT4=ALGAL**, **AARPt4** y **ADHA4** (*figura 4b*). Demostrar que las condiciones de cultivo **ADHA** y **AEPA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) ajustaron su **CPT** a una tendencia lineal positiva con un r^2 de 0,75 y 0,89 respectivamente (*figura 5a-b*).

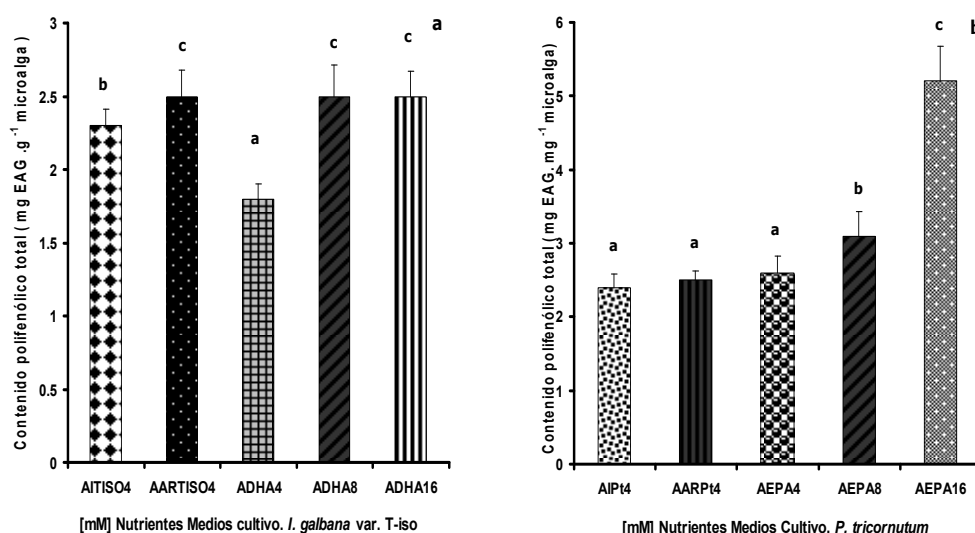


Figura 4. Contenido polifenólico total (mg EAG.g⁻¹ microalga), **(a)** *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes medios de cultivo, **(b)** *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes formulaciones de cultivo. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

Para las microalgas aquí estudiadas es nula la información acerca del **CPT**, sin embargo en macroalgas algunos autores han demostrado un **CPT** inferior (ver *tabla 5*) a los resultados del presente estudio (ver *tabla 5*); en tanto que otros autores (Duan *et al.*,2006) han señalado un alto **CPT** en extractos y fracciones en diferentes tipos de solventes entre 8,16 y 73,7 mg EAG. g⁻¹ de macroalga (*tabla 5*); no comparable con los resultados de nuestras microalgas; esto puede atribuirse al tamaño de muestra para obtención de los extractos y a la polaridad de los solventes empleados (*tabla 5*). Al respecto Li *et al.*,2007 empleando en los extractos de 23 microalgas, solventes como hexano y étil-acetato para determinar el **CPT** obtiene entre un 2,37-39,87 y 0,01-9,80 mg EAG. g⁻¹ de microalga respectivamente. Zubia *et al.*,2007 evaluando el **CPT** de 48 macroalgas utilizando 5 g liofilizados de material y extrayendo con diclorometano:metano (2:1), obtiene valores entre 0,34 y 8,13 mg EAG. g⁻¹ de macroalga valores por encima de nuestros resultados, considerando que en el presente estudio solo fueron empleados 30mg de material.

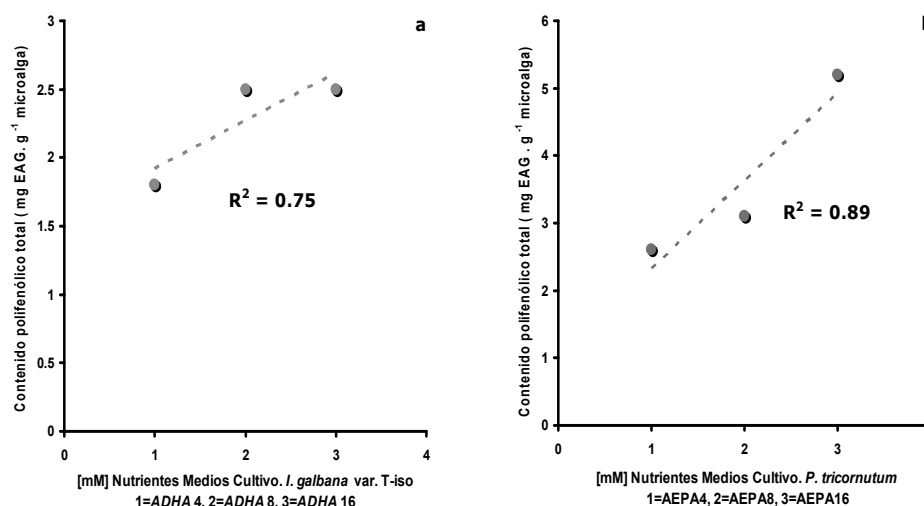


Figura 5. Coeficientes de correlación Contenido polifenólico total (mg EAG.g⁻¹ microalga), **(a)** *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con **ADHA**4, 8 y 16mM, **(b)** *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con **AEPA**4, 8 y 16mM.

Correlación entre Actividad Antioxidante (AA) y Contenido Polifenólico Total (CPT) (descrita previamente por Wangenstein *et al.*,2004) con el solvente metanol: se obtuvieron los siguientes coeficientes de correlación (R^2) 0,40, 0,84, 0,75 y 0,96 (revelando una asociación positiva $p<0,001$) para *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivadas e enriquecidas con las formulaciones **AIPT4=ALGAL**, **AARPt4**, **AITISO4=ALGAL** y **AARTISO4** (figura 6 a-b y 7 a-b) respectivamente.

Del mismo modo la condición de cultivo **AEPA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) indicó R^2 de 0,96, 0,87, 0,92 ($p<0,001$) ver figura 6 c,d,e; en tanto que la condición **ADHA**4, 8 y 16mM expresó $R^2=0,95$, 0,82 y 0,98 ($p<0,001$) (figura 7 c,d,e). Valores de correlación que se encontraron muy por encima de lo reportado por Li *et al.*,2007 con otro tipo de solventes y especies microalgales ya que con hexano obtienen solo un $R^2=0,0075$, con étil-acetato un $R^2=0,5851$ y con agua $R^2=0,3599$.

En lo que respecta a macroalgas donde se empleo el mismo tipo de solvente que el presente estudio, otros más con diferente polaridad y mezclas de los mismos sus coeficientes de correlación para DPPH y polifenoles totales son de naturaleza inferior en *Polysiphonia urceolata* con un $R^2=0,83$ y $0,89$ ($p<0,001$) y *Symphycladia latiuscula* con $R^2=0,72$ y $0,77$ ($p<0,001$) (Duan *et al.*,2006; Zhang *et al.*,2007). El **CPT** en base a los altos coeficientes de correlación descritos se podría presumir contribuyen a la **AA** de las microalgas y sus variedades aquí motivo de estudio; ya que las microalgas producen una amplia gama de antioxidantes incluyéndose los carotenoides, ácidos grasos poliinsaturados, polisacáridos etc (Chen, 1996; Chen *et al.*,2005; Guzmán-Murillo *et al.*,2007), sin embargo aun no existe evidencia científica concreta que evidencie que todos los compuestos fenólicos contribuyan a su capacidad antioxidante.

En estudios previos ya fueron demostradas correlaciones significativas en varias macroalgas (Jiménez-Escrig *et al.*,2001); sin embargo pocos son los estudios donde se relacionan estos parámetros en microalgas. Aunque los compuestos fenólicos pueden ser los principales antioxidantes en bastantes especies de plantas como verduras, frutas y plantas medicinales (Lee *et al.*,2003; Cai *et al.*,2004; Soong and Barlow, 2004; Wong *et al.*,2006).

Importante destacar que la manipulación bioquímica de la cual fueron objeto las microalgas aquí estudiadas mediante su cultivo con diferentes formulaciones contribuyó en la obtención de altos coeficiente de correlación de estos dos parámetros de estudio, punto importante e innovador biotecnológicamente hablando. En base a la diversidad microalgal es que se asume que aun existe un gran número de compuestos polifenólicos por descubrir y caracterizar y que contribuyen a la actividad antioxidante de estas, como ocurre con plantas superiores.

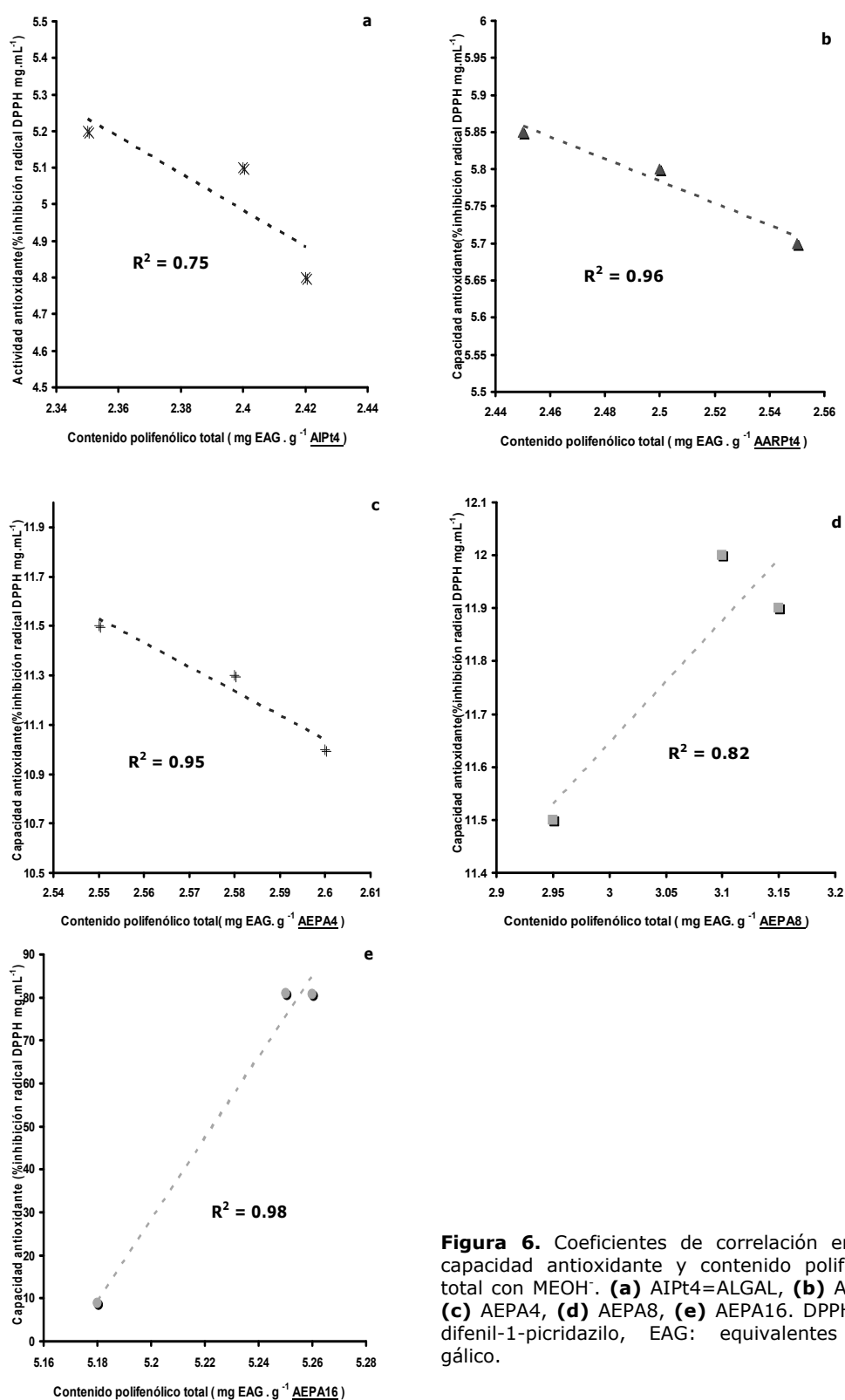
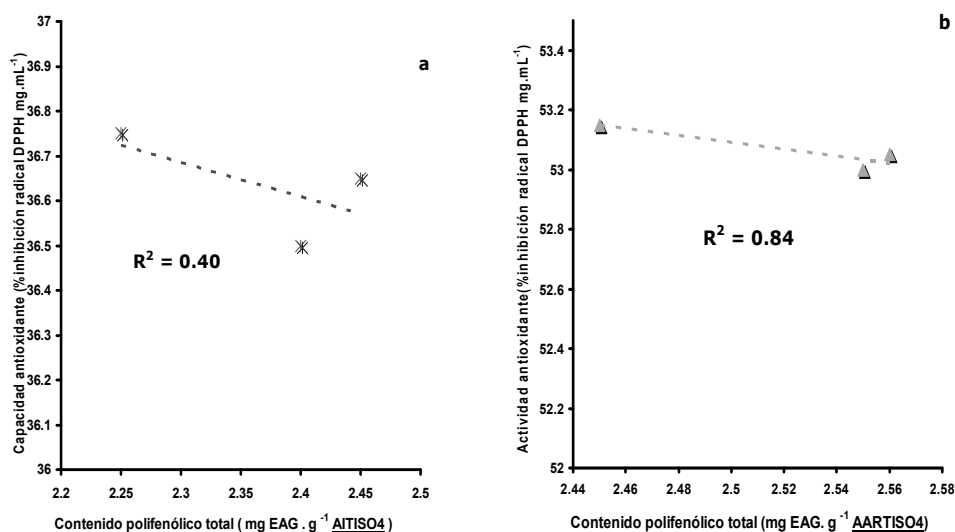


Figura 6. Coeficientes de correlación entre la capacidad antioxidante y contenido polifenólico total con MEOH⁻. **(a)** AIPt4=ALGAL, **(b)** AARPt4, **(c)** AEPA4, **(d)** AEPA8, **(e)** AEPA16. DPPH: 2,2-difenil-1-picridazilo, EAG: equivalentes ácido gálico.

Se han desarrollado y utilizado diferentes métodos para la determinación de la actividad antioxidante en diferentes fracciones. En nuestros resultados el ensayo con DPPH para determinar el % de inhibición del radical, se considera adecuado para evaluar sistemáticamente el total de la capacidad antioxidante del extracto con metanol de *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. T-iso con valores altos (tabla 2) comparados con la determinación efectuada con el radical Trolox por Li *et al.*, 2007 para la evaluación de la actividad antioxidante y contenido polifenólico total en 23 diferentes microalgas. Mencionar además que la resolución de nuestros resultados se considera rápida, simple y fiable (Molyneux 2004) en virtud de que en nuestras determinaciones solo se emplearon 30 mg de microalga liofilizada en comparación de los 200 mg de microalga empleada por el ya citado autor (tabla 2). La actividad antioxidante de los supuestos antioxidantes en las microalgas del presente estudio puede atribuirse a varios mecanismos. Entre estos esta la prevención e iniciación en cadena de la unión y catálisis de iones metálicos dada la complejidad mineral de los medios de cultivo de las microalgas de este estudio (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-}); descomposición de complejos peróxidos, y prevención a la acción y eliminación de radicales OH^{\cdot} , lo que nos explicaría la variabilidad de los coeficientes de correlación encontrados entre la **AA** y el **CPT** (Heinoman *et al.*, 1998; Cakir *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005). Al respecto Huang *et al.*, 2001, 2002; Li *et al.*, 2003, mencionan que el selenio suele ser un componente importante a nivel celular, es decir selenoenzimas y selenoproteínas, desempeñando un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular y proteger los lípidos, lipoproteínas y daño oxidativo del ADN en células animales; por lo que *Spirulina platensis* ha sido consumida como alimento y suplemento nutricional por bastante tiempo y ha sido investigada como una matriz para la producción de compuestos que contienen selenio, transformando selenio inorgánico en selenio orgánico en vivo cuando se le cultiva con medios ricos en selenio.



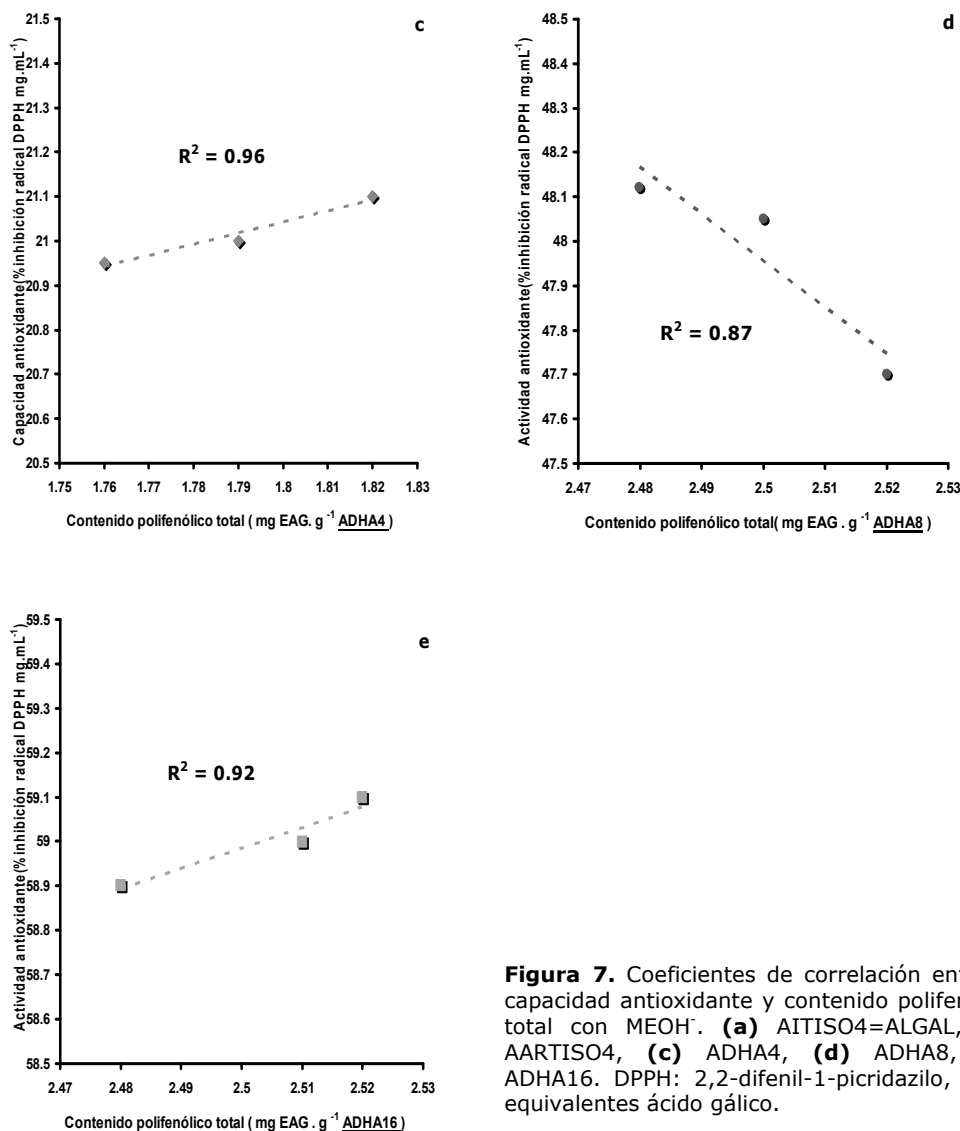


Figura 7. Coeficientes de correlación entre la capacidad antioxidante y contenido polifenólico total con MEOH⁻. **(a)** AITISO4=ALGAL, **(b)** AARTISO4, **(c)** ADHA4, **(d)** ADHA8, **(e)** ADHA16. DPPH: 2,2-difenil-1-picridazilo, EAG: equivalentes ácido gálico.

Los bajos índices de correlación encontrados en las condiciones de cultivo **AIPt4=ALGAL** ($R^2=0,75$ $p<0,05$) y **AITISO4=ALGAL** ($R^2=0,40$ $p<0,05$) con respecto a los demás tratamientos que poseen una mayor complejidad mineral es debido posiblemente a que su contenido polifenólico total no incluye en cantidad todos los antioxidantes que poseen las microalgas cultivadas con las nuevas formulaciones de cultivo (**AARPt4**, **AARTISO4**, **AEPA4**, **8 y 16**, **ADHA4**, **8 y 16**). Además de que tal vez haya otros antioxidantes que son estructuralmente diferentes de compuestos fenólicos existentes en las microalgas modificadas bioquímicamente por los diferentes medios de cultivo, tales como ácido ascórbico, carotenoides y tocoferol (Sun and Ho 2005).

Los compuestos fenólicos han sido altamente reconocidos por su importante papel como antioxidantes dietéticos y agentes quimiopreventivos (Bravo 1998). Informes anteriores han descrito la existencia de una relación directa entre la actividad antioxidante y el contenido polifenólico total en algunas hierbas, vegetales y frutas (Velioglu *et al.*, 1998). Sin embargo también existen algunos informes donde no encuentran relación alguna

(Kähkönen *et al.*,1999). En el presente estudio encontramos que en *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivadas con diferentes formulaciones, hacen figurar diversas proporciones de componentes fenólicos además de promover diversos grados de actividad antioxidante; al respecto Guzmán-Murillo *et al.*,2007 cultivando con diferente fuente de nitrógeno a *Phaeodactylum tricornutum* obtiene diferentes proporciones de exopolisacáridos los cuales desencadenan diversos contenidos de superóxido dismutasa.

Tabla 1. Actividad radical por DPPH (Actividad Antioxidante AA) para fracciones derivadas de la extracción con metanol *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* (T-iso), modificadas bioquímicamente en régimen semicontinuo.

Fracción en MeOH ⁺ (30mg.mL ⁻¹)		Actividad antioxidante ± SD (%) de Inhibición		
Microalga		16 min.	60 min.	120 min. Total
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AIPt4=ALGAL)		5,0 ± 0,56	-----	----- 5,0 ± 0,56a
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AARPt4)		5,8 ± 0,34	-----	----- 5,8 ± 0,34a
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AEPa4)		12,0 ± 1,40	-----	----- 11,0 ± 1,40a
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AEPa8)		11,0 ± 0,70	-----	----- 12,0 ± 0,70a
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AEPa16)		-----	36,0 ± 1,4	45,0 ± 0,78 81,0 ± 2,18b
<i>Isochrysis galbana</i> (T-iso) (AITISO4=ALGAL)		-----	16,0 ± 0,89	21,0 ± 0,98 37,0 ± 1,87b
<i>Isochrysis galbana</i> (T-iso) (AARTISO4)		-----	24,0 ± 0,70	29,0 ± 0,90 53,0 ± 1,60cd
<i>Isochrysis galbana</i> (T-iso) (ADHA4)		-----	21,0 ± 1,4	----- 21,0 ± 1,4a
<i>Isochrysis galbana</i> (T-iso) (ADHA8)		-----	21,0 ± 0,79	27,0 ± 0,67 48,0 ± 1,46d
<i>Isochrysis galbana</i> (T-iso) (ADHA16)		-----	27,0 ± 1,50	32,0 ± 1,4 59,0 ± 2,90c

Cada valor es presentado como la media ± la SD (n = 3). Las medias en cada columna con diferente letra (a-d comparación múltiple de Tukey) presentan diferencias altamente significativas (p<0,05).

Tabla 2. Capacidad antioxidante (% inhibición) $\mu\text{mol Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$ 200mg Li et al., 2007, mg EAG $\cdot \text{g}^{-1}$ 30mg (presente estudio en diferentes fracciones en microalgas).

Microalgas	Fracción hexano	Fracción etil-acetato	Fracción agua	Fracción metanol	Total
<i>Anabaena flos-aquae</i> FACHB 245	9.27±0.27	5.83±0.24	2.16±0.22	----	17.26±0.73
<i>Chlamydomonas nivalis</i>	11.42±0.13	10.79±0.28	1.92±0.07	----	24.13±0.47
<i>Chlorella protothecoides</i> #7	3.49±0.13	5.73±0.22	0.01±0.00	----	9.22±0.35
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> #1	8.48±0.42	5.80±0.11	3.05±0.13	----	17.32±0.66
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> #2	2.14±0.06	3.92±0.17	3.91±0.09	----	9.97±0.33
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> #3	2.14±0.04	6.08±0.21	7.49±0.20	----	15.71±0.44
<i>Chlorella vulgaris</i> #4	2.11±0.12	3.50±0.24	3.59±0.34	----	9.20±0.70
<i>Chlorella vulgaris</i> #5	5.53±0.05	6.54±0.26	3.43±0.20	----	15.50±0.51
<i>Chlorella vulgaris</i> #8	1.43±0.18	2.49±0.08	1.75±0.14	----	5.67±0.39
<i>Chlorella zofingiensis</i>	1.83±0.21	2.31±0.02	1.19±0.01	----	5.33±0.24
<i>Cryptocodinium cohnii</i> 30556	0.01±0.00	0.37±0.04	5.91±0.17	----	6.27±0.20
<i>Cryptocodinium cohnii</i> 316	0.37±0.01	0.01±0.00	1.80±0.05	----	2.17±0.06
<i>Cryptocodinium cohnii</i> 50051	0.41±0.03	0.25±0.06	2.38±0.14	----	3.03±0.23
<i>Cryptocodinium cohnii</i> RJH	0.36±0.05	0.31±0.06	5.41±0.19	----	6.08±0.30
<i>Nitzschia laevis</i>	2.21±0.32	5.30±0.20	6.12±0.25	----	13.62±0.76
<i>Nostoc ellipsosporum</i> CCAP 1453/11	2.39±0.26	6.52±0.54	3.10±0.35	----	12.00±1.15
<i>Nostoc ellipsosporum</i> CCAP 1453/16	0.08±0.00	0.40±0.10	1.89±0.26	----	2.37±0.36
<i>Nostoc ellipsosporum</i> CCAP 1453/17	3.84±0.09	8.03±0.89	9.23±0.86	----	21.09±1.83
<i>Nostoc ellipsosporum</i> CCAP 1453/19	1.80±0.24	4.31±0.25	7.70±0.24	----	13.82±0.73
<i>Schizochytrium</i> sp. # 5	0.12±0.03	0.16±0.18	4.57±0.11	----	4.85±0.32
<i>Schizochytrium mangrovei</i> BF3	0.01±0.00	0.01±0.00	1.33±0.12	----	1.33±0.12
<i>Synechococcus</i> sp. FACHB 283	7.17±0.32	16.0±0.61	6.39±0.30	----	29.56±1.24
<i>Thraustochytrium</i> sp. 26185	0.01±0.00	0.26±0.03	2.00±0.10	----	2.26±0.13
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AIPt4=ALGAL)	----	----	----	5.0±0.56	5.0±0.56
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AARPt4)	----	----	----	5.8±0.34	5.8±0.34
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AEPt4)	----	----	----	11.0±1.4	11.0±1.40
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AEPt8)	----	----	----	12.0±0.70	12.0±0.70
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AEPt16)	----	----	----	81.0±2.18	81.0±2.18
<i>Isochrysis galbana</i> var. T-iso (AITISO4=ALGAL)	----	----	----	37.0±1.87	37.0±1.87
<i>Isochrysis galbana</i> var. T-iso (AARTISO4)	----	----	----	53.0±1.60	53.0±1.60
<i>Isochrysis galbana</i> var. T-iso (ADHA4)	----	----	----	21.0±1.40	21.0±1.40
<i>Isochrysis galbana</i> var. T-iso (ADHA8)	----	----	----	48.0±1.46	48.0±1.46
<i>Isochrysis galbana</i> var. T-iso (ADHA16)	----	----	----	59.0±2.90	59.0±2.90

EAG: equivalentes ácido gálico. ----: no determinado. Cada valor es presentado como la Media \pm SD ($n = 3$)

Tabla 3. Capacidad antioxidante (% inhibición radical DPPH) en diferentes fracciones para macroalgas y microalgas.

Macroalgas	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	(G)	Autor
<i>Corralina elongata</i>	---	25.6±0.03	---	---	---	---	58.5±0.04	Nahas et al., 2007
<i>Laurencia obtusa</i>	---	17.7±0.05	---	---	---	---	65.9±0.06	Nahas et al., 2007
<i>Laurencia papillosa</i>	---	12.4±0.04	---	---	---	---	55.8±0.03	Nahas et al., 2007
<i>Peyssonnelia harvellana</i>	---	4.90±0.03	---	---	---	---	17.3±0.02	Nahas et al., 2007
<i>Rhodotamniella floridula</i>	---	20.9±0.01	---	---	---	---	53.1±0.06	Nahas et al., 2007
<i>Taonia atomaria</i>	---	1.00±0.01	---	---	---	---	5.10±0.02	Nahas et al., 2007
<i>Amphiroa</i> sp	---	7.70±0.02	---	---	---	---	35.8±0.03	Nahas et al., 2007
<i>Halopteris scoparia</i>	---	9.80±0.04	---	---	---	---	45.5±0.02	Nahas et al., 2007
<i>Titanoderma bissoides</i>	---	35.8±0.07	---	---	---	---	110.3±0.90	Nahas et al., 2007
<i>Sargassum vulgare</i>	---	15.6±0.04	---	---	---	---	60.2±0.01	Nahas et al., 2007
<i>Dictyopteris membranacea</i>	---	5.50±0.03	---	---	---	---	25.4±0.01	Nahas et al., 2007
<i>Amphiroa cryptarthrodia</i>	---	8.00±0.08	---	---	---	---	36.8±0.02	Nahas et al., 2007
<i>Liagora</i> sp	---	30.9±0.04	---	---	---	---	80.5±0.04	Nahas et al., 2007
<i>Polysiphonia urceolata</i>	5.92±0.13	---	67.9±0.61	11.8±2.12	93.9±0.12	28.2±0.46	---	Duan et al., 2006
<i>Symphycladia latiuscula</i>	3.04±0.55	---	94.43±0.37	10.0±0.27	94.08±0.24	39.79±1.36	---	Zhang et al., 2007
Microalgas								
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AIPt4=ALGAL)	---	---	---	---	---	---	5.0±0.56	Este estudio
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AARPt4)	---	---	---	---	---	---	5.8±0.34	Este estudio
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AEPa4)	---	---	---	---	---	---	11.0±1.40	Este estudio
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AEPa8)	---	---	---	---	---	---	12.0±0.70	Este estudio
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AEPa16)	---	---	---	---	---	---	81.0±2.18	Este estudio
<i>Isochrysis galbana</i> var. T-iso (AITISO4=ALGAL)	---	---	---	---	---	---	37.0±1.87	Este estudio
<i>Isochrysis galbana</i> var. T-iso (AARTISO4)	---	---	---	---	---	---	53.0±1.60	Este estudio
<i>Isochrysis galbana</i> var. T-iso (ADHA4)	---	---	---	---	---	---	21.0±1.4	Este estudio
<i>Isochrysis galbana</i> var. T-iso (ADHA8)	---	---	---	---	---	---	48.0±2.90	Este estudio
<i>Isochrysis galbana</i> var. T-iso (ADHA16)	---	---	---	---	---	---	59.0±1.46	Este estudio

(A): Resíduo acuoso (50 µg), (B): Extracto Diclorometano (30mg), (C): Extracto Crudo (50µg), (D): Fracción Éter Petróleo (50 µg), (E): Fracción Etil-acetato (50 µg), (F): Fracción *n*-Butanol (50 µg), (G): Extracto Metanol (30mg). ---: no determinado. Cada valor es presentado como la Media ± SD (*n* = 3)

Tabla 4. Contenido polifenólico total (mg GAE/g) para fracciones derivadas de la extracción con metanol *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* (T-iso), modificadas bioquímicamente en régimen semicontinuo.

Microalga	Fracción en MeOH. Contenido polifenólico total (mg EAG.g ⁻¹ microalga)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AIPt4=ALGAL)	2,40 ± 0,18a
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AARPt4)	2,50 ± 0,13a
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AEPa4)	2,60 ± 0,23a
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AEPa8)	3,10 ± 0,33b
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AEPa16)	5,20 ± 0,48c
<i>Isochrysis galbana</i> (T-iso) (AITISO4=ALGAL)	2,30 ± 0,11b
<i>Isochrysis galbana</i> (T-iso) (AARTISO4)	2,50 ± 0,18c
<i>Isochrysis galbana</i> (T-iso) (ADHA4)	1,80 ± 0,10a
<i>Isochrysis galbana</i> (T-iso) (ADHA8)	2,50 ± 0,21c
<i>Isochrysis galbana</i> (T-iso) (ADHA16)	2,50 ± 0,17c

El contenido polifenólico total es expresado como equivalentes de ácido gálico (EAG mg.g⁻¹ de microalga liofilizada). Cada valor es expresado como la media ± SD (n = 3). Medias en la columna con diferente letra (a-d **comparación múltiple de Tukey**) presentan diferencias significativas (p<0,05)

Tabla 5. Contenido polifenólico total de extractos de macroalgas^a y microalgas^b

Macroalgas	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	(G)	Autor
Chlorophyta								
<i>Cladophora vagabunda</i>	1.23±0.1							Zhang et al.,2007
<i>Codium fragile</i>	0.27±0.0							Zhang et al.,2007
Phaeophyta								
<i>Desmarestia viridis</i>	1.42±0.1							Zhang et al.,2007
<i>Dictyopteris divaricata</i>	0.96±0.0							Zhang et al.,2007
<i>Ectocarpus siliculosus</i>	0.87±0.0							Zhang et al.,2007
<i>Laminaria japonica</i>	0.32±0.0							Zhang et al.,2007
<i>Sargassum horneri</i>	0.41±0.0							Zhang et al.,2007
<i>Sargassum thunbergii</i>	0.29±0.0							Zhang et al.,2007
<i>Scytosiphon lomentaria</i>	0.52±0.0							Zhang et al.,2007
Rhodophyta								
<i>Ahnfeltiopsis flabelliformis</i>	0.21±0.0							Zhang et al.,2007
<i>Ceratium kondoii</i>	0.44±0.0							Zhang et al.,2007
<i>Chondria crassicaulis</i>	2.36±0.1							Zhang et al.,2007
<i>Chondria tenuissima</i>	1.19±0.1							Zhang et al.,2007
<i>Chondrus ocellatus</i>	0.12±0.0							Zhang et al.,2007
<i>Chrysomenia wrightii</i>	1.24±0.1							Zhang et al.,2007
<i>Corallina officinalis</i>	0.30±0.0							Zhang et al.,2007
<i>Gelidium amansii</i>	0.43±0.0							Zhang et al.,2007
<i>Gloiopeltis furcata</i>	1.47±0.1							Zhang et al.,2007
<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	0.62±0.0							Zhang et al.,2007
<i>Gracilaria lemaneiformis</i>	0.88±0.0							Zhang et al.,2007
<i>Gracilaria gracilis</i>	0.10±0.0							Zhang et al.,2007
<i>Gracilaria textorii</i>	0.67±0.0							Zhang et al.,2007
<i>Grateloupia filicina</i>	0.22±0.0							Zhang et al.,2007
<i>Heterosiphonia japonica</i>	3.06±0.1							Zhang et al.,2007
<i>Hyalosiphonia caespitosa</i>	0.27±0.0							Zhang et al.,2007
<i>Lomentaria hakodatensis</i>	0.72±0.0							Zhang et al.,2007
<i>Plocamium telfairiae</i>	0.35±0.0							Zhang et al.,2007
<i>Symphycladia latiuscula</i>	8.0±0.1							Zhang et al.,2007
<i>Polysiphonia urceolata</i>	---		71.6±0.0	11.3±0.1	73.7±0.0	52.1±0.3	8.16±0.0	Duan et al.,2006
Microalgas								
Bacillariophyta								
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> #1	2.40±0.2							Este estudio
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> #2	2.50±0.1							Este estudio
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> #3	2.60±0.2							Este estudio
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> #4	3.10±0.3							Este estudio
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> #5	5.20±0.4							Este estudio
Haptophyta								
<i>Isochrysis galbana</i> var.T-iso *1	2.30±0.1							Este estudio
<i>Isochrysis galbana</i> var.T-iso *2	2.50±0.2							Este estudio
<i>Isochrysis galbana</i> var.T-iso *3	1.80±0.1							Este estudio
<i>Isochrysis galbana</i> var.T-iso *4	2.50±0.2							Este estudio
<i>Isochrysis galbana</i> var.T-iso *5	2.50±0.2							Este estudio

^{a,b}Contenido polifenólico total es expresado como equivalentes de ácido gálico (mg EAG. g⁻¹ macro y microalga). **(A):** Extracto Metanol-Cloroformo (2:1) (100mg), **(B):** Extracto Metanol (30mg), **(C):** Extracto Crudo (100g), **(D):** Fracción Éter Petróleo (100g), **(E):** Fracción Etil-acetato (100g), **(F):** Fracción *n*-Butanol (100g), **(G):** Residuo acuoso (100g). -- -: no determinado. **#1:** AIPt4=ALGAL, **#2:** AARpt4, **#3:** AEPA4, **#4:** AEPA8, **#5:** AEPA16. ***1:** AITISO4=ALGAL, ***2:** AARTISO4, ***3:** ADHA4, ***4:** ADHA8, ***5:** ADHA16. Cada valor es presentado como la Media ± SD (*n* = 3)

Capítulo 11

Estudio del **Tamaño Celular** (FS), **Complejidad Celular o Granularidad** (SS) y **Autofluorescencia** (C/a), por Citometría de Flujo, en las microalgas ***Phaeodactylum tricornutum*** e ***Isochrysis galbana*** var. T-iso, manipuladas bioquímicamente con los medios de cultivo **Algal Alta Rendimiento (AARPt, AARTISO)** y **Algal Incremento Concentración EPA y DHA**.

Introducción

La citometría de flujo durante las últimas dos décadas ha sido reconocida como una poderosa herramienta en el estudio del fitoplancton además de permitir determinar un elevado número de funciones celulares en tiempo real, además del tamaño, complejidad y autofluorescencia de la clorofila celular, a gran velocidad y simultáneamente. Asimismo de otros constituyentes subcelulares como enzimas, lípidos, ácidos nucleicos y toxinas (Burkill and Mantoura 1990; Dubelaar *et al.*, 2007; Cellamare *et al.*, 2010; Lopes de Silva *et al.*, 2010), donde las células se mueven en un flujo, utilizando una amplia variedad de moléculas bioquímicamente específicas, no tóxicas y fluorescentes, en condiciones muy cercanas al estado *in vivo* en exposiciones no prolongadas a niveles de luz muy elevados. El tiempo de aceleración en un citómetro y el paso de la célula frente al haz de luz del láser se producen en unas fracciones de segundo, de modo que el proceso de medida ejerce una influencia mínima sobre las células. Los resultados del análisis se presentan normalmente en forma de un histograma de distribución de la población celular con respecto a los parámetros analizados (Shapiro, 1990). La información se obtiene a través del uso de varias propiedades ópticas de las células o partículas, de un rango de tamaño entre 1 y 150 μm .

La epifluorescencia o citometría de flujo basada en láser, la autofluorescencia de los pigmentos, la fluorescencia inducida por tinciones y la luz dispersada son utilizadas como sondas para cuantificar subpoblaciones en cultivos microalgales y en poblaciones naturales de fitoplancton. Esta técnica cuando se combina con tinciones bioquímicas selectivas y tecnología de inmunofluorescencia hace posible la medida simultánea de parámetros como clorofila, proteína, ADN, además de la luz dispersada en 90° , sobre células o partículas individuales. Las medidas se hacen a tasas entre 1000-100000 células por segundo (Shapiro, 1988). La probabilidad de procesar un gran número de partículas permite un análisis estadístico riguroso, incluso para muestras naturales heterogéneas (Cid 1993).

Cuando la célula pasa frente al haz de láser en el citómetro de flujo produce una señal con una intensidad determinada; esta señal es detectada por un fotosensor que la convierte en un pulso electrónico cuya amplitud es proporcional a la intensidad de la señal. El pulso se procesa a través de amplificadores logarítmicos. El amplificador logarítmico convierte la amplitud de la señal en su logaritmo. En cada caso la amplitud del pulso se mide en voltios y se convierten en un número canal, que varía entre 0 y 1023, para una resolución de 1024 canales. Este número canal es proporcional al logaritmo de la señal. El pico-canal se corresponde con el canal en el que aparece la moda de la distribución de datos en cada caso. El tamaño celular se detecta en función de la luz refractada en un ángulo $<25^\circ$, lo que se conoce como luz refractada en el ángulo anterior o dispersión frontal de la luz ("Forward Light Scatter" o FSC) (Shapiro, 1988). La granularidad celular se detecta en función de la luz refractada en un ángulo $>68^\circ$, que es lo que se denomina luz refractada lateralmente ("Side Light Scatter" o SSC).

Dado que la mayoría de las microalgas marinas unicelulares presentan generalmente una fluorescencia natural muy fuerte, pudiendo medirla en una o varias longitudes de onda, la autofluorescencia es la que corresponde con la señal emitida por las clorofilas y pigmentos relacionados tras ser excitadas a 488 nm; la emisión fluorescente captada es la que se encuentra por encima de los 645 nm (FL4), pudiendo ser capaz de diferenciar los grupos de fitoplancton, hasta cierto punto (Dubelaar and Jonker, 2000; Bouman *et al.*, 2006; Duchemin *et al.*, 2008). La evaluación de las células se realizó en torno a las 10,000 y 15,000 unidades, lo que nos da una gran capacidad de medidas multiparamétricas y gran tamaño de la población analizada.

La citometría de flujo como una biotecnología médica, además de emplearse en la cuantificación del fitoplancton y sus parámetros, es útil también para evaluar la absorción de partículas por bivalvos (Li *et al.*, 2009), e inmunología de vertebrados e invertebrados (Auffret, 2005).

Diseño experimental

Para el análisis de estos 3 parámetros celulares en *Phaeodactylum tricornutum* (**AIPt4=ALGAL, AARPt4, AEPA4, 8 y 16**) e *Isochrysis galbana* var. T-iso (**AITISO4=ALGAL, AARTISO4, ADHA4, 8 y 16**) se fijaron ($n=3$) muestras celulares en cultivo semicontinuo de 1 mL con 100 μ L de la formulación hecha con paraformaldehído (PFA) y glutaraldehído (P+G) (1%P+0,05%G final); posteriormente se ultracongelaron a -50°C . La fijación facilita la entrada de los fluorocromos que tiñen los ácidos nucleicos (Bullock and Petrusz, 1984; Sato *et al.*, 2006). Vaultot *et al.*, 1989; Burkill and Mantoura 1990; sugieren la utilización de glutaraldehído al 1% y Premazzi *et al.*, 1989 desarrollaron un protocolo con paraformaldehído (libre de metanol) entre 0,1 y 0,5%. Por lo que Troussellier *et al.*, 1995 realizan un comparativo, concluyendo que el PFA o formalina es mejor que el glutaraldehído, tanto para la permeabilización celular (facilitando una posterior tinción) para un mejor mantenimiento de la fluorescencia. Además el PFA no modifica las características de tamaño celular. Las muestras se pincharon en un citómetro FACScan Becton-Dickinson, con el programa de análisis LYSIS II de la misma marca: La fuente de luz que empleo este fotómetro es un láser de ión argón, que emite a 488 nm (luz azul).

Resultados y discusión.

El empleo de diferente complejidad elemental en las formulaciones de cultivo en *Phaeodactylum tricornutum* (**AIPt4=ALGAL, AARPt4, AEPA4, 8 y 16**, capítulos 5 y 7) e *Isochrysis galbana* var. T-iso (**AITISO4=ALGAL, AARTISO4, ADHA4, 8 y 16**, capítulos 5 y 6), produjo una marcada diversidad en el volumen o tamaño celular (**FSC**), los cuales se pueden observar en los *histogramas 1 a-e* y *2 a-e* respectivamente, una vez analizadas por citometría de flujo. Dichas células mostraron así un cambio de volumen o tamaño referido en porcentaje (ver *figura 1 a-b*) con respecto a los medios **AIPt4** y **AITISO4** (control) de acuerdo a la ecuación descrita por Reader *et al.*, 1993:

$$\%V=100-[100(V_{AIPt4 \text{ o } AITISO4} - V_{AARPt4, AARTISO4, AEPA4,8, 16, ADHA4,8,16}) / V_{AIPt4 \text{ o } AITISO4}]$$

Donde %V es el porcentaje de variación del tamaño celular problema; $V_{AIPt4 \text{ o } AITISO4}$ es el tamaño medio celular del control, expresado en no. de canales y $V_{AARPt4, AARTISO4, AEPA4,8, 16, ADHA4,8,16}$ es el tamaño medio celular con diferentes medios de cultivo en *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. T-iso respectivamente.

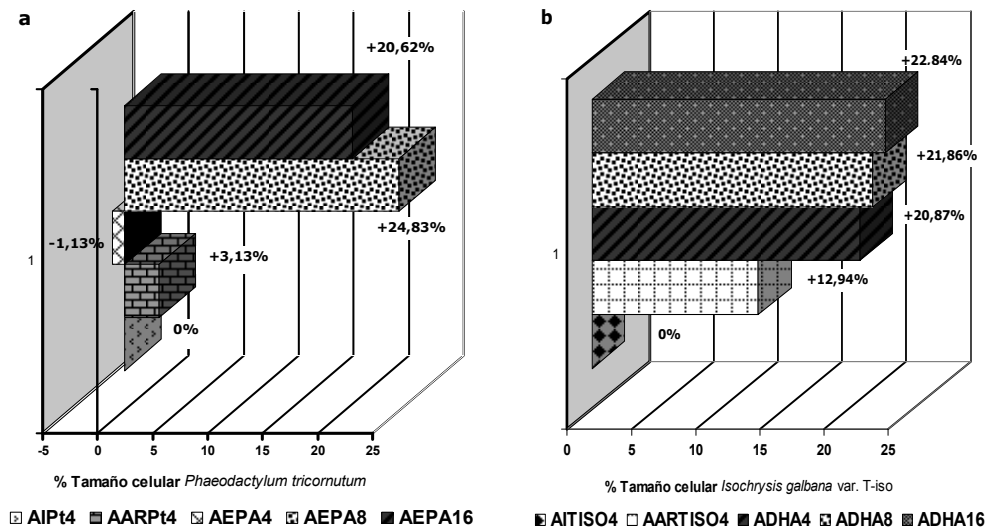
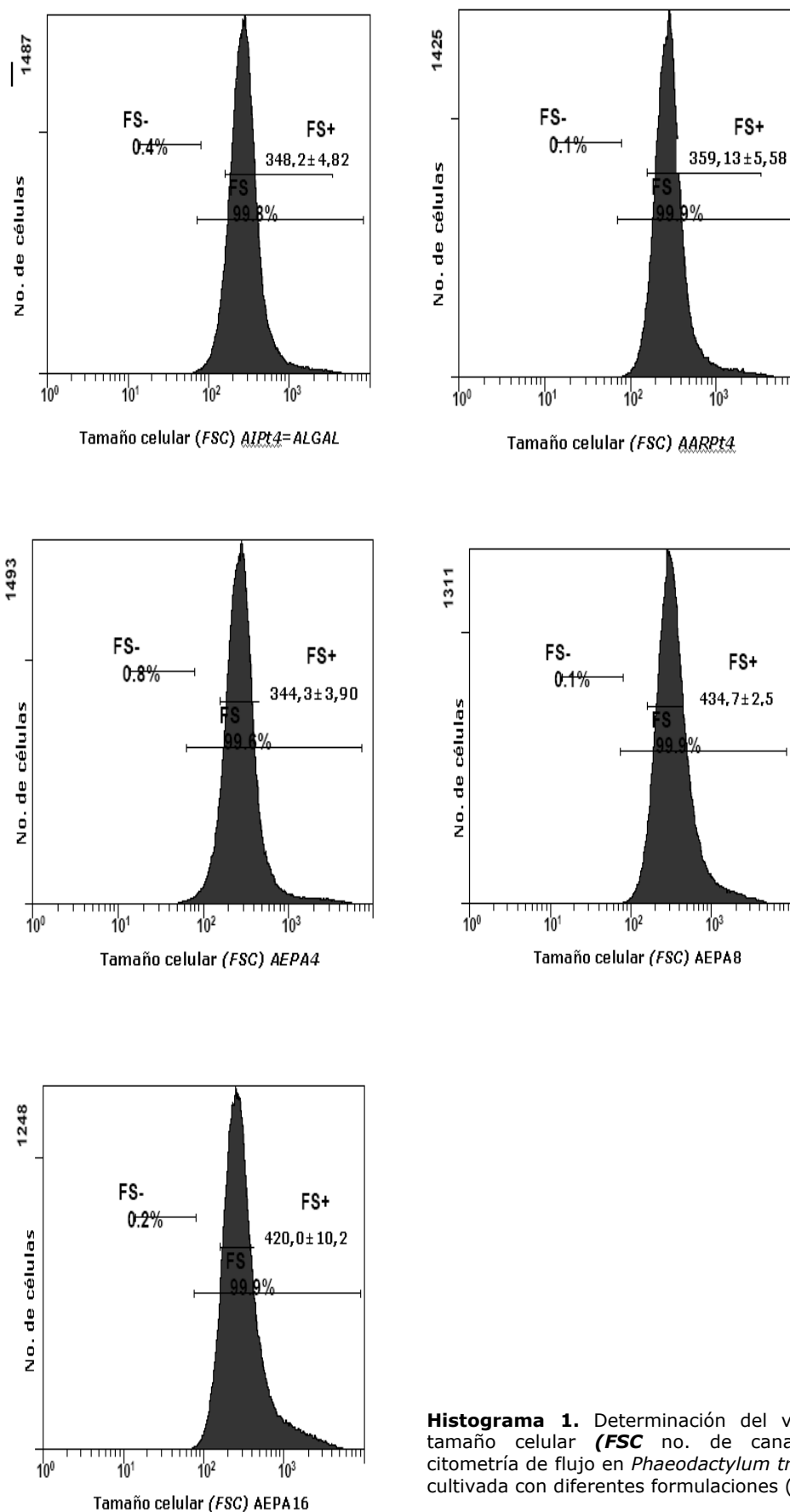


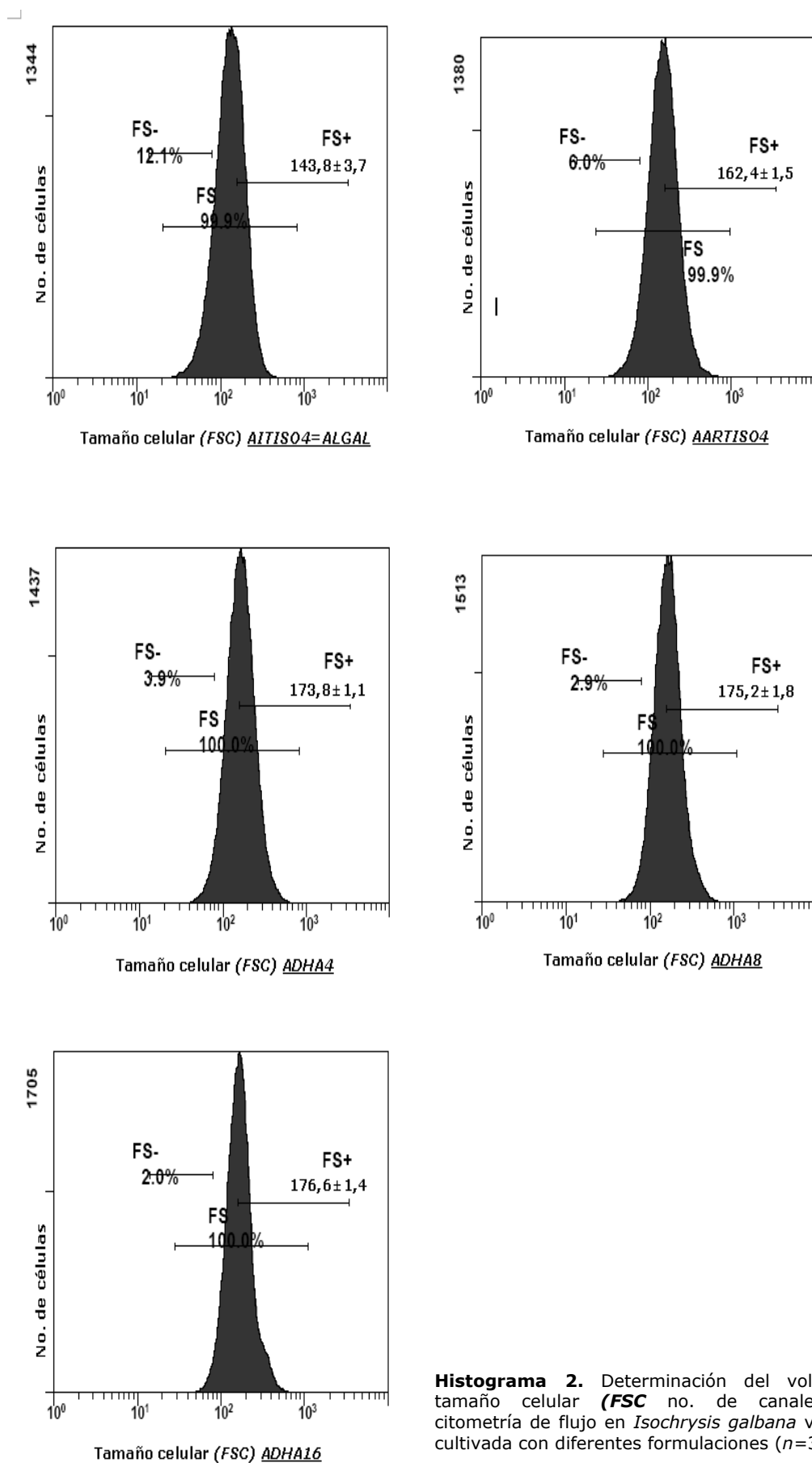
Figura 1. Volumen o tamaño celular (**FSC No. de canales**), por citometría de flujo en *Phaeodactylum tricornutum* (**a**) e *Isochrysis galbana* var. T-iso (**b**) cultivadas con diferentes formulaciones. Los resultados se expresan como porcentaje de la variación del tamaño celular de las condiciones **AARPt4, AARTISO4, AEPA4, 8 16** y **ADHA4, 8 16** con respecto al tamaño celular de **AIPt4** y **AITISO4** (control). Media \pm SD ($n=3$).

Los resultados de la citometría de flujo nos indicaron la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo ($p<0,05$) en ambas microalgas; ver figura 2 a-b, tabla 1. Indicar además que las condiciones de cultivo **AEPA** y **ADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM), observaron coeficientes de correlación $R^2=0,75$ y 1 correspondientemente (figura 3 a-b) con ajuste a una tendencia lineal positiva en el incremento del tamaño celular.

El volumen o tamaño celular es una característica importante en un microorganismo unicelular para su posterior empleo en la base de la cadena trófica en acuicultura.



Histograma 1. Determinación del volumen o tamaño celular (**FSC** no. de canales), por citometría de flujo en *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes formulaciones ($n=3$)



Histograma 2. Determinación del volumen o tamaño celular (**FSC** no. de canales), por citometría de flujo en *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes formulaciones ($n=3$)

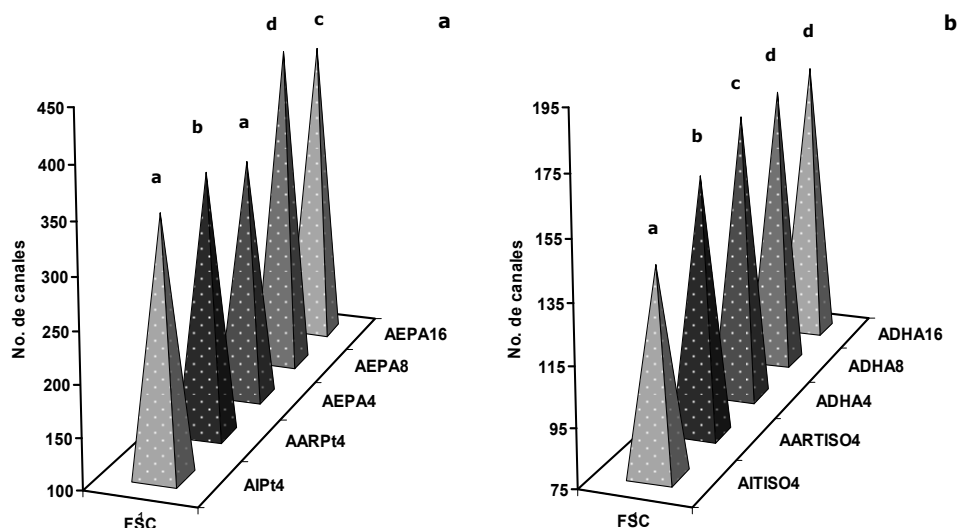


Figura 2. Volumen o tamaño celular (**FSC No. de canales**), por citometría de flujo en *Phaeodactylum tricornutum* (**a**) e *Isochrysis galbana* var. T-iso (**b**) cultivadas con diferentes formulaciones. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

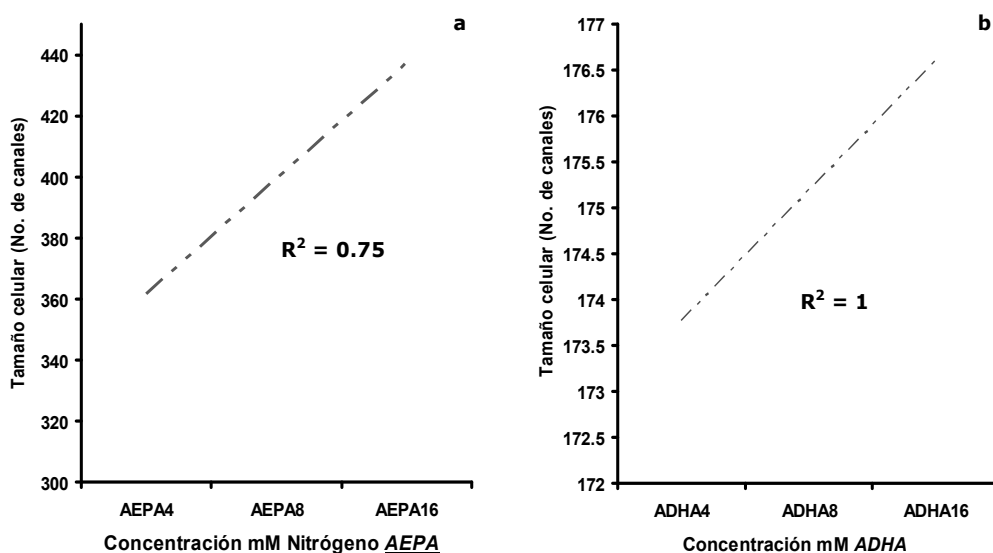


Figura 3. Coeficientes de correlación del volumen o tamaño celular (No. de canales), (**a**) *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con **AEPA**, (**b**) *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con **ADHA** y diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM).

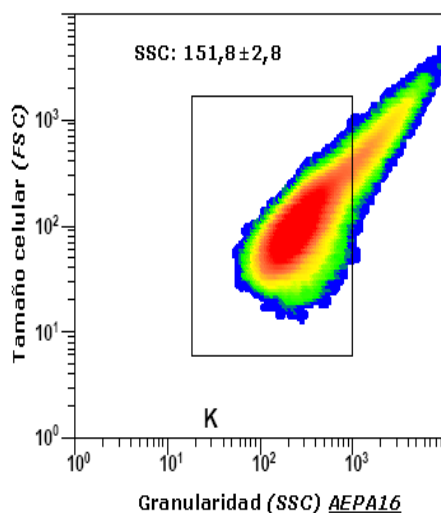
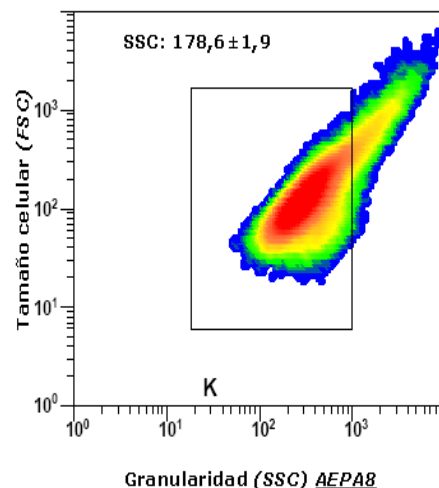
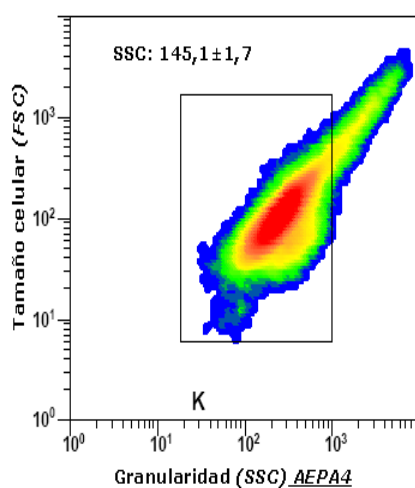
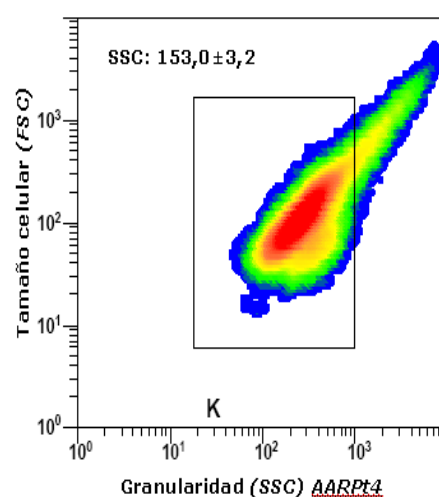
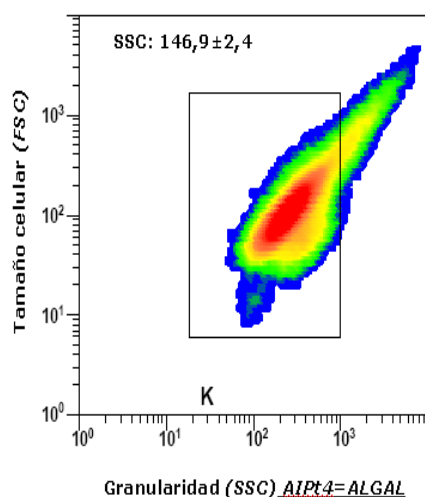
Otero 1994 en su estudio sobre la modificación de la composición bioquímica de *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con el medio "ALGAL" (Fábregas *et al.*, 1984) en régimen de ciclostato, evaluó por citometría de flujo su tamaño celular, hallando que este se incrementaba con la concentración de nutrientes, tal y como ocurrió en el presente estudio con las formulaciones de cultivo **AEPA** y **ADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM, *figura 3 a-b* y *tabla 1*). Así mismo sucedió con la diferencia de tamaño que mostraron las células con las condiciones de cultivo **AARPt4** y **AARTISO4** con mayor complejidad mineral con respecto a las células cultivadas con **AIpt4**, y **AITISO4** ("ALGAL") (*tabla 1*) las cuales tuvieron menor complejidad mineral.

Stauber and Florence 1987; Cid 1993; Umorin and Lind 2005, indican que cuando se incrementa la concentración de un elemento o nutriente con base en el tiempo de exposición se produce un aumento del volumen o tamaño celular, el cual según estudios del segundo autor en *Phaeodactylum tricornutum* incorporando cobre en altas concentraciones por lapsos de 96h logra hasta un 125% de mayor tamaño con respecto al tiempo cero. Los resultados del tamaño celular en nuestro estudio son en un máximo de 24h dado que los cultivos se encontraron en semicontinuo con una tasa diaria de renovación del 30%, lo que produjo aumentos de tamaño dada la complejidad elemental (**AARPt4, AEPA4, 8 y 16**) de entre un 3,13 y 24,83% en células de *Phaeodactylum tricornutum* con respecto a **AIPt4=ALGAL** (figura 1a), en tanto que en células de *Isochrysis galbana* var. T-iso (**AARTISO4, ADHA4, 8 y 16**) se hallaron incremento de tamaños de entre el 12,94 y 22,84% con respecto a células cultivadas con **AITISO4=ALGAL** (figura 1b). Stokes *et al.*,1973 indican un aumento de tamaño en células de *Chlorella* y *Scenedesmus*, las cuales al dividirse recuperan su tamaño normal cuando son transferidas a un medio libre de cobre. Bolaños *et al.*,1992 en la cianobacteria *Anabaena* observa mediante microscopia electrónica de transmisión, deterioro y aumento de su tamaño celular cuando es expuesta a concentraciones altas de cadmio.

Fábregas *et al.*,1996a; Fábregas *et al.*,1996b mencionan que *Phaeodactylum tricornutum* incrementa su volumen celular con la tasa de renovación lo que sugiere un mayor contenido de minerales por otra parte Reboloso Fuentes *et al.*,2000 mencionan que si los minerales son biodisponibles, no tóxicos o antinutricionales serán empleados fisiológicamente y nutricionalmente por las células en adecuado balance de su concentración (Carvalho *et al.*,2006). En condición de abundancia de nutrientes, las microalgas captan mayores cantidades de elementos del medio, es así que la presión osmótica celular aumenta, dando lugar a una mayor absorción de aniones y cationes.

Algunos elementos como el cobre afectan los mecanismos de regulación del tamaño celular (Riisgard *et al.*,1980), debido tal vez al incremento de la permeabilidad al sodio o reduciéndola al potasio y cloro. Tal hecho podría explicar el incremento del tamaño en las células de *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivadas con formulaciones (capítulo 5) más complejas sobre las menos complejas.

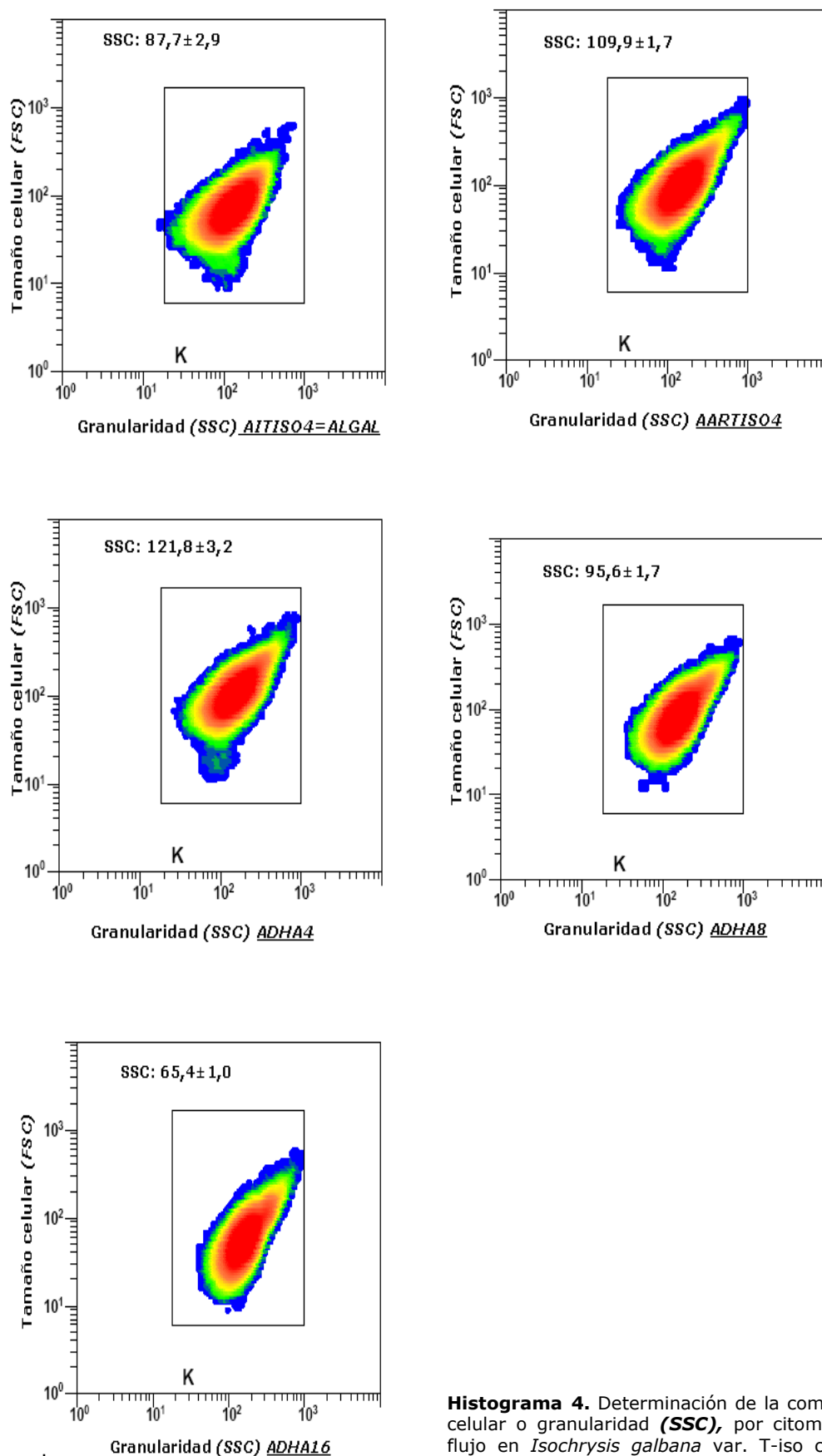
En lo que respecta a la complejidad celular o granularidad (**SSC**) debida a la composición elemental en las formulaciones de cultivo con *Phaeodactylum tricornutum* (**AIPt4=ALGAL, AARPt4, AEPA4, 8 y 16**) e *Isochrysis galbana* var. T-iso (**AITISO4=ALGAL, AARTISO4, ADHA4, 8 y 16**); la citometría de flujo indico diferencias las cuales se pueden observar en los *histogramas 3 a-e* y *4 a-e* respectivamente. Resultados que nos revelaron la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las condiciones de cultivo ($p<0,05$) en ambas microalgas, observar *figura 4 a-b* y *tabla 1*. Indicar además que las condiciones de cultivo **AEPA** y **ADHA** con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM), mostraron coeficientes de correlación $R^2=1$ y 0,99 con ajuste a una tendencia polinomial en el primer caso en tanto que en el segundo a una tendencia lineal negativa (*figura 5 a-b*) en términos de granularidad.



Histograma 3. Determinación de la complejidad celular o granularidad (**SSC**), por citometría de flujo en *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes formulaciones ($n=3$).

Katsuragi and Tani 2001 mencionan que son diversos los métodos de marcaje por los cuales es posible apreciar la complejidad interna celular. Al respecto Stauber and Florence 1987 observaron cambios morfológicos en células de la diatomea *Nitzschia closterium* con diferentes concentraciones de cobre. Cid 1993 en *Phaeodactylum tricornutum* observa cambios en la complejidad interna celular cuando expone a las células a altas concentraciones de cobre. Smith 1983 en la diatomea *Dytilum brigtwellii* expuesta a cobre revela un alejamiento del protoplasma de la pared celular y los cloroplastos agrupados. Rachlin *et al.*, 1982 efectuando un análisis morfométrico de la cianobacteria *Plectonema boryanum* expuesta a cobre mostró un descenso del área superficial en los tilacoides, reducción en el volumen de las inclusiones lipídicas y la aparición de cuerpos granulares electrodensos. Daniel and Chamberlain, 1981 en la diatomea *Amphora veneta* observaron cuerpos polifosfatados que contenían además de fósforo, calcio y cobre dentro de las vacuolas así como cuerpos cúpricos asociados a membranas que poseían azufre, calcio y cobre. Sicko-Goad, 1982, menciona que la granularidad también puede deberse a un aumento del número o tamaño de las vacuolas, que poseen la facultad de excretar el metal que esta absorbiéndose en exceso al interior de la célula. La incorporación de elementos en las microalgas se produce en dos fases, la primera que es muy rápida es la adsorción fisicoquímica en la superficie de las células, y la segunda fase que es muy lenta, es la acumulación intracelular (dependiente del metabolismo). Moreno-Garrido *et al.*, 1998, 1999; Schmitt *et al.*, 2001 informan que las microalgas acumulan grandes cantidades de elementos como el cobre y silicio los cuales no segregan al medio de cultivo hasta después de algún tiempo.

Si bien en *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var., T-iso describimos diversa granularidad en sus células, no podemos establecer a que mecanismo celular en concreto son debidas, pero si podemos aseverar que la complejidad elemental de las formulaciones de cultivo **AARPt4**, **AARTISO4**, **AEPA4**, **8 16** y **ADHA4**, **8 16** modificaron su complejidad celular.



Histograma 4. Determinación de la complejidad celular o granularidad (**SSC**), por citometría de flujo en *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes formulaciones ($n=3$)

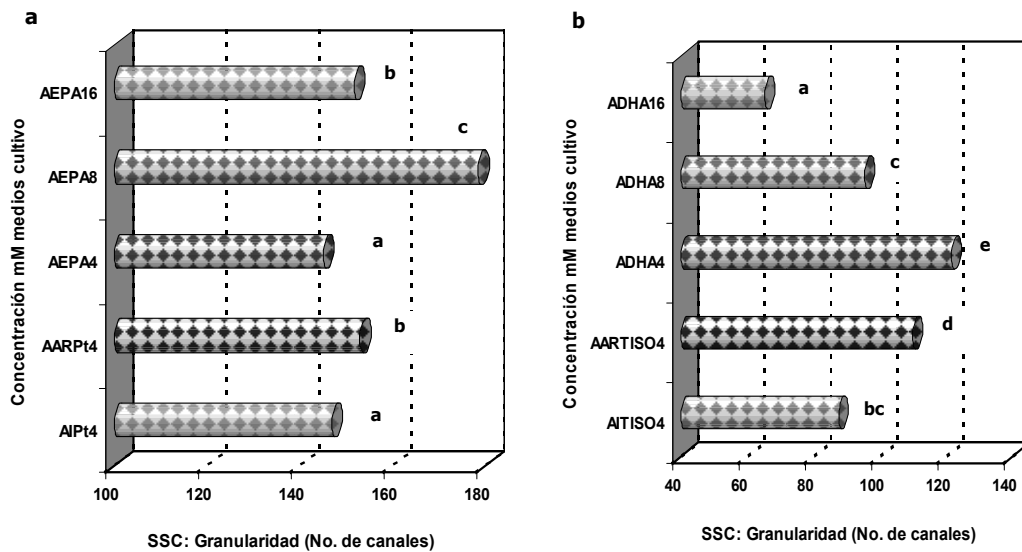


Figura 4. Complejidad celular o granularidad (**SSC No. de canales**), por citometría de flujo en *Phaeodactylum tricornutum* **(a)** e *Isochrysis galbana* var. T-iso **(b)** cultivadas con diferentes formulaciones. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

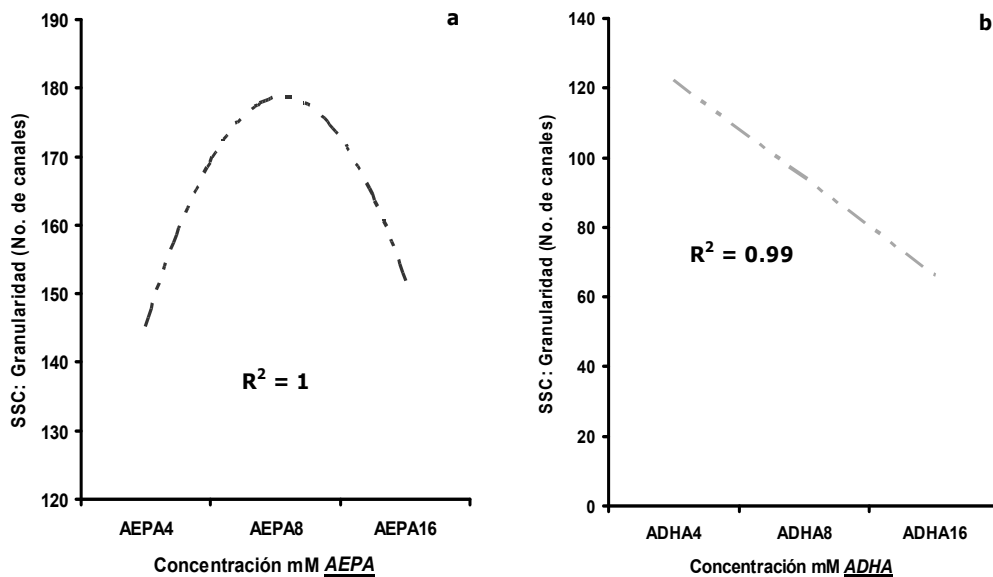


Figura 5. Coeficientes de correlación de la complejidad celular o granularidad (No. de canales), **(a)** *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con **AEPA**, **(b)** *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con **ADHA** y diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM).

Un parámetro más, medido por citometría de flujo fue la autofluorescencia de la clorofila *a* (**FL4**) en *Phaeodactylum tricornutum* (**AIPT4=ALGAL**, **AARPt4**, **AEPA4**, **8 y 16**) e *Isochrysis galbana* var. T-iso (**AITISO4=ALGAL**, **AARTISO4**, **ADHA4**, **8 y 16**); autofluorescencia que nos indico marcadas diferencias, que se observan en los *histogramas* 5 a-e y 6 a-e respectivamente. Tales diferencias son aun más claras cuando en dichas células se muestra la autofluorescencia referida en términos de porcentaje (ver *figura* 6 a-b) con respecto a las condiciones de cultivo **AIPT4** y **AITISO4** que son las condiciones control sobre

Capítulo 11: Estudio del **Tamaño Celular** (FS), **Complejidad Celular o Granularidad** (SS) y **Autofluorescencia** (C/a), por Citometría de Flujo, en las microalgas ***Phaeodactylum tricornutum*** e ***Isochrysis galbana*** var. T-iso, manipuladas bioquímicamente.

las cuales fueron formuladas los medios de cultivo **AARPt4**, **AARTISO4**, **AEPA4**, **8 16** y **ADHA4**, **8 16** (capítulos 5, 6 y 7) y en los cuales se esperaron diferencias de acuerdo a la ecuación descrita por Reader *et al.*, 1993:

$$\%F = 100 - [100(F_{AIPt4 \text{ o } AITISO4} - F_{AARPt4, AARTISO4, AEPA4, 8, 16, ADHA4, 8, 16}) / F_{AIPt4 \text{ o } AITISO4}]$$

Donde %F es el porcentaje de variación de la autofluorescencia celular problema; $F_{AIPt4 \text{ o } AITISO4}$ es la autofluorescencia media celular del control, expresada en no. de canales y $F_{AARPt4, AARTISO4, AEPA4, 8, 16, ADHA4, 8, 16}$ es la autofluorescencia celular media con diferentes formulaciones de cultivo en *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. T-iso.

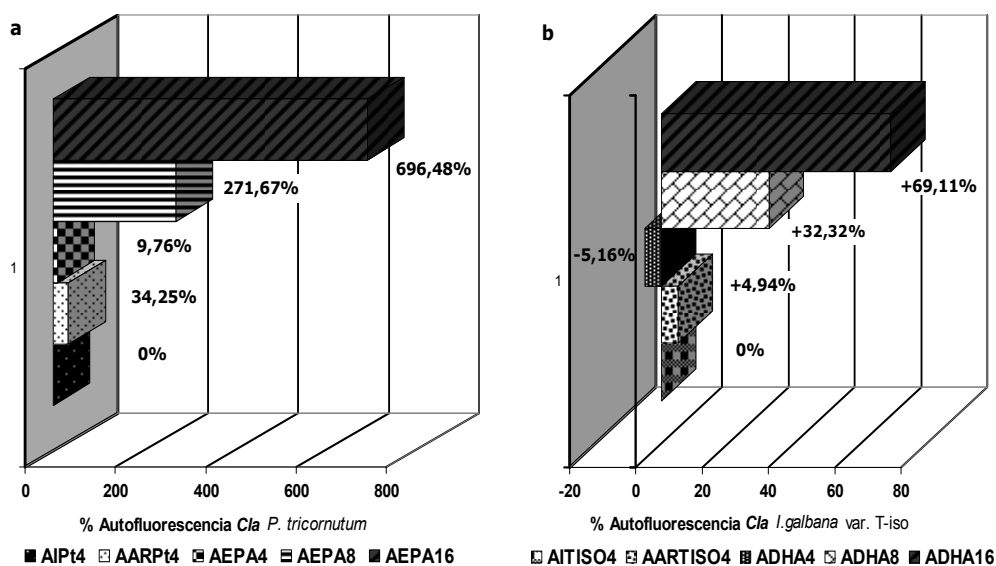
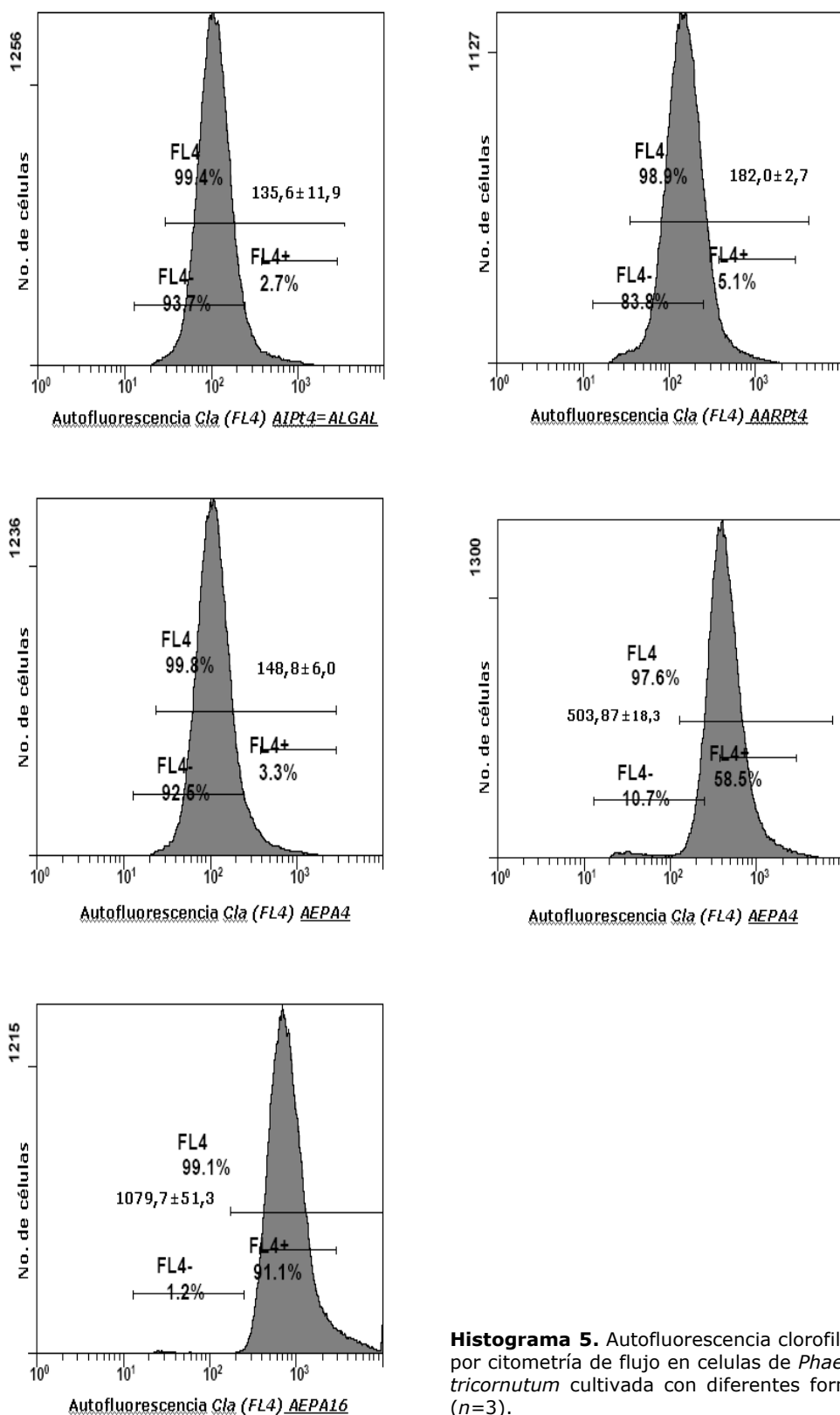
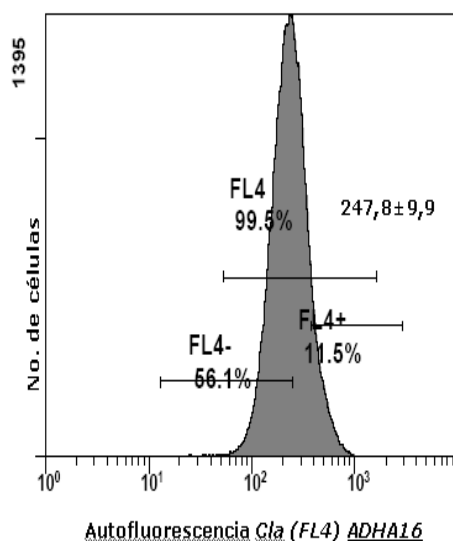
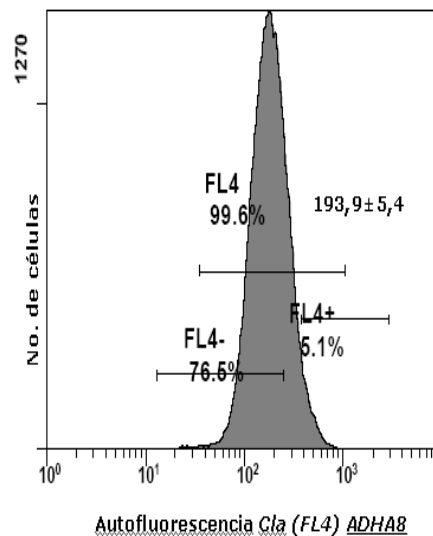
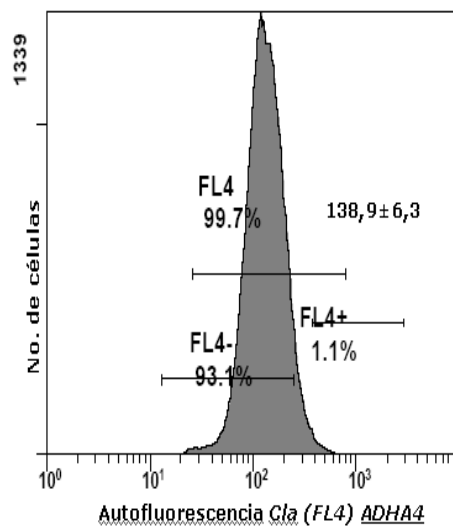
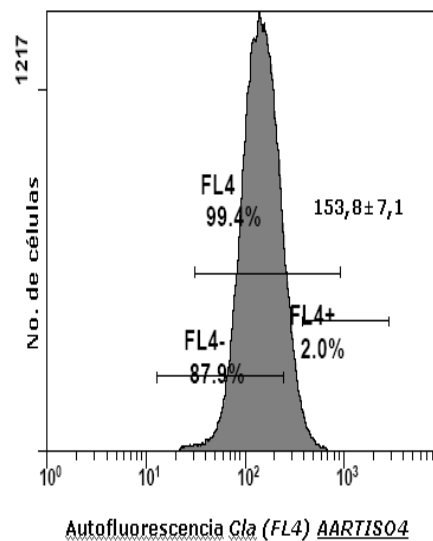
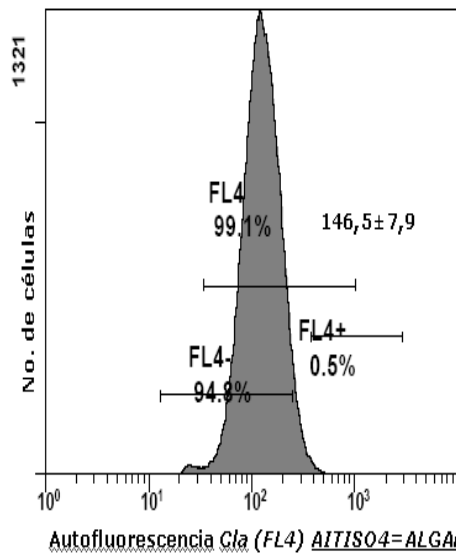


Figura 6. Autofluorescencia C/a (**FL4** No. de canales), por citometría de flujo en *Phaeodactylum tricornutum* (**a**) e *Isochrysis galbana* var. T-iso (**b**) cultivadas con diferentes formulaciones. Los resultados se expresan como porcentaje de la autofluorescencia celular de las condiciones **AARPt4**, **AARTISO4**, **AEPA4**, **8 16** y **ADHA4**, **8 16** con respecto a la autofluorescencia celular de **AIPt4** y **AITISO4** (controles). Media \pm SD ($n=3$).

Los valores hallados por citometría de flujo nos revelaron la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0,001$) entre las diferentes formulaciones de cultivo ($p<0,05$) en ambas microalgas, ver *figura 7 a-b* y *tabla 1*. Indicar igualmente que las condiciones **AEPA** y **ADHA** cultivadas con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM), mostraron coeficientes de correlación $R^2=0,98$ y 1 con ajuste a una tendencia lineal positiva en el contenido de clorofila *a* (*figura 8 a-b*).



Histograma 5. Autofluorescencia clorofila *a* (**FL4**), por citometría de flujo en células de *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con diferentes formulaciones (*n*=3).



Histograma 6. Autofluorescencia clorofila *a* (**FL4**), por citometría de flujo en células de *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con diferentes formulaciones ($n=3$).

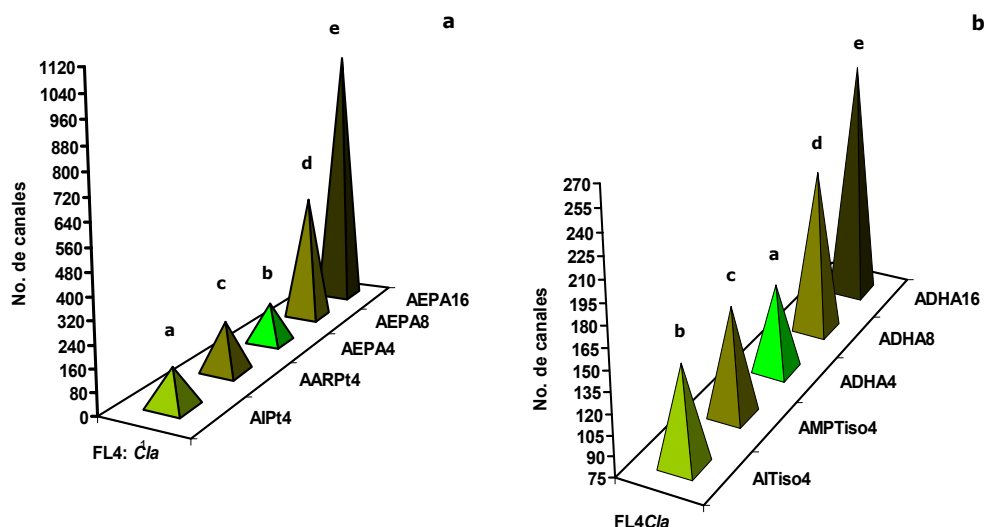


Figura 7. Autofluorescencia clorofila *a* (FL4 No. de canales), por citometría de flujo en células de *Phaeodactylum tricornutum* (a) e *Isochrysis galbana* var. T-iso (b) cultivadas con diferentes formulaciones. Media \pm SD ($n=3$). Diferentes letras (comparación múltiple de Tukey), existe diferencia altamente significativa ($p<0,05$).

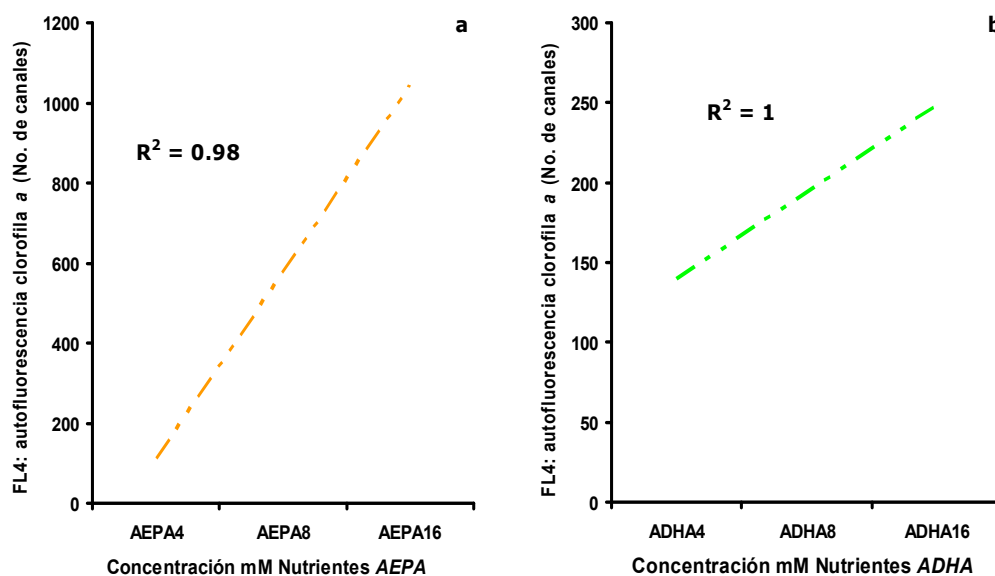


Figura 8. Coeficientes de correlación Autofluorescencia clorofila *a* (FL4) (No. de canales), (a) *Phaeodactylum tricornutum* cultivada con **AEPA**, (b) *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivada con **ADHA** y diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM).

Con respecto a este parámetro celular, Otero 1994 menciona que un incremento de la cantidad de clorofila total por célula en cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* con una tasa de renovación del 30% es debido a la suficiencia de nutrientes (4, 8 y 16mM) empleados en el medio de cultivo "ALGAL" (Fábregas *et al.*, 1984), además coadyuvado por una limitación por luz, debido a la elevada densidad celular generada, tal y como sucedió con la generación de biomasa del presente estudio; sin embargo en nuestros resultados no solo

influyo la concentración de nutrientes en el medio de cultivo y una supuesta limitación por luz, sino además la nueva complejidad mineral que poseen las formulaciones **AARPt4**, **AARTISO4**, **AEPA** y **ADHA4**, **8** **16**, con respecto a la presente en el medio de cultivo "**ALGAL**"=**AIpt4**, **AITISO4**. Dados los valores medios de clorofila *a* (tabla 1), hallados en células cultivadas con los ya citados medios, es que probablemente no exista ningún tipo de estrés que coadyuve a la degradación de la clorofila lo que no permitiría una reducción de las membranas del tilacoides en *Phaeodactylum tricornutum* (Osborne and Geider, 1986), ni en *Isochrysis galbana* var. T-iso; ambas cultivadas con una mayor complejidad mineral.

Cid 1993 indica que igual como ocurre en el tamaño celular, cuando se incrementa la concentración de un elemento con base en el tiempo de exposición se produce un aumento de la autofluorescencia de la clorofila *a*, la cual según estudios en *Phaeodactylum tricornutum* incorporando cobre en altas concentraciones por lapsos de 72h logra hasta un 185% de fluorescencia con respecto al tiempo cero. Los resultados de autofluorescencia de la clorofila *a* en el presente estudio son en un máximo de 24h dado que los cultivos se encontraron en semicontinuo con una tasa diaria de renovación del 30%, lo que produjo aumentos de la fluorescencia dada la complejidad elemental (**AARPt4**, **AEPA4**, **8** y **16**) de entre un 9,76 y 696,48% en células de *Phaeodactylum tricornutum* con respecto a **AIpt4=ALGAL** (figura 6a), resultados que superan por mucho los descritos por el anterior autor para la misma diatomea; en tanto que en células de *Isochrysis galbana* var. T-iso (**AARTISO4**, **ADHA4**, **8** y **16**) se halló una fluorescencia de entre el 4,94 y 69,11% con respecto a células cultivadas con **AITISO4=ALGAL** (figura 6b).

Por otra parte el programa de análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo proporciona suficientes argumentos para asegurar que los valores de autofluorescencia de la clorofila *a* en las células de *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. T-iso se corresponden con el tamaño celular generado por las diferentes formulaciones de cultivo (figura 9 a-b), con un coeficiente de correlación $R^2 = 0,75$ y $0,72$ respectivamente, con ajuste en ambas microalgas a una tendencia lineal positiva. Coeficientes de correlación también altos han sido descritos cuando se correlaciona la autofluorescencia con diversa variedad de fracciones lipídicas y ácidos grasos altamente poliinsaturados como el DHA y EPA (de la Jara et al., 2003)

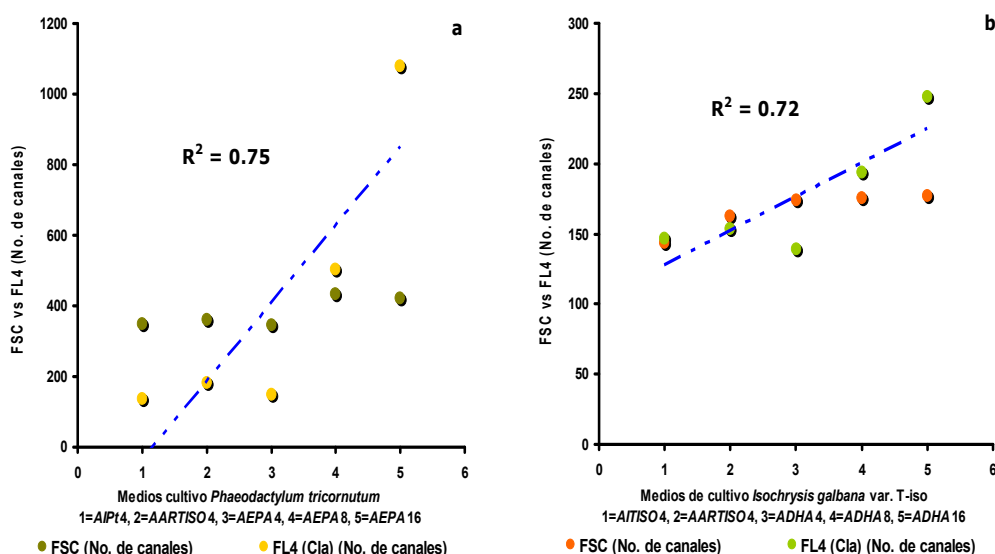


Figura 9. Coeficientes de correlación Tamaño celular (**FSC**) vs Autofluorescencia clorofila **a** (**FL4**) (No. de canales), **(a)** *Phaeodactylum tricornutum*, **(b)** *Isochrysis galbana* var. T-iso; cultivadas con diferentes formulaciones.

Cid 1993 menciona que el estudio de las reacciones de la cadena de transporte electrónico es difícil de visualizar en células microalgales intactas ya que los aceptores o donadores exógenos penetran muy difícilmente en ellas. Sin embargo, la medida de autofluorescencia de la clorofila *a* (C/a) en células intactas proporciona información acerca de la absorción, distribución y utilización de la energía en la fotosíntesis (Murthy *et al.*, 1990). La autofluorescencia de la C/a es en particular sensible al funcionamiento del fotosistema II. Los cambios de fluorescencia de la C/a a temperatura ambiente están principalmente asociados con la actividad del fotosistema II (PS II) y reflejan el estado redox del aceptor primario de electrones en el centro de reacción del PS II a moléculas de plastoquinona-9 (Q_A) y feofitina-*a* mediante la transferencia de electrones fotoinducida desde el donador primario P₆₈₀ a un grupo de plastoquinona (Murthy *et al.*, 1990; Tanaka-Kitatani *et al.*, 1990; Renger and Holzwarth 2005; Govindjee, 2008). Cualquier inhibición del flujo de electrones del centro de reacción del PS II desde el lado del donador disminuye la fluorescencia de la clorofila *a*, mientras que el bloqueo del aceptor del PS II la incrementa (Samson *et al.*, 1988), situación que pudo haber ocurrido con las células cultivadas con las nuevas formulaciones **AARPt4**, **AARTISO4**, **AEPA4**, **8 16** y **ADHA4**, **8 16** con mayor complejidad mineral con respecto a las cultivadas con los medios **AIPt4=ALGAL** y **AITISO4=ALGAL** las cuales son menos complejas.

Tabla 1. Volumen o tamaño celular (**FSC**), complejidad celular o granularidad (**SSC**) y autofluorescencia-clorofila a (**FL4**) (valores expresados en número de canales) de células de *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. T-iso; cultivadas con diferentes formulaciones.

Microalga	FSC	SSC	FL4
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AIPt4=ALGAL)	348,2±4,82a	146,93±2,37a	135,57±11,97a
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AARPt4)	359,13±5,58b	153,03±3,21b	182,00±2,71c
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AEPa4)	344,27±3,90a	145,10±1,69a	148,8±6,02b
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AEPa8)	434,67±2,55d	178,57±1,94c	503,87±18,33d
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (AEPa16)	420,0.±10,23c	151,80±2,84b	1079,77±51,28e
<i>Isochrysis galbana</i> (T-iso) (AITISO4=ALGAL)	143,76±3,70a	87,67±2,90bc	146,53±7,95b
<i>Isochrysis galbana</i> (T-iso) (AARTISO4)	162,37±1,51b	109,97±1,67d	153,77±7,10c
<i>Isochrysis galbana</i> (T-iso) (ADHA4)	173,77±1,13c	121,80±3,17e	138,97±6,27a
<i>Isochrysis galbana</i> (T-iso) (ADHA8)	175,20±1,85d	95,63±1,67c	193,90±5,41d
<i>Isochrysis galbana</i> (T-iso) (ADHA16)	176,60±1,45d	65,43±1,01a	247,80±9,90e

Cada valor es presentado como la media ± la SD ($n = 3$). Las medias en cada columna con diferente letra (a-d comparación múltiple de Tukey) presentan diferencias altamente significativas ($p<0,05$).

Resultados

Capítulo 1 y 2

Las densidades celulares de los cultivos discontinuo y semicontinuo en *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. T-iso, utilizando las diferentes concentraciones de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} produjo diferencias altamente significativas así mismo, en la composición bioquímica y en el conjunto de los ácidos grasos ω -3 y con énfasis en los ácidos grasos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) respectivamente. Estos resultados sugirieron que determinadas concentraciones de cada elemento en cada microalga, produjeron rendimientos celulares superiores.

Una característica fue que, en cualesquiera de los anteriores comportamientos, la incorporación celular de los elementos se comportó de manera lineal, que reveló una herramienta importante de transporte, teniendo en cuenta la importancia fisiológica y enzimática que tienen estos elementos en los siguientes niveles tróficos.

Capítulo 3 y 4

El cultivo de enriquecimiento del rotífero *Brachionus plicatilis* y de *Artemia franciscana* con *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. T-iso, las cuales fueron a su vez cultivadas de manera individual en régimen semicontinuo con Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en las concentraciones que produjeron el alto rendimiento celular (capítulos 1 y 2), produjeron en base a su diversa calidad bioquímica, en los varios cultivos de rotíferos y *Artemia*, diferencias altamente significativas entre ellos en la generación de densidad poblacional (rotífero), supervivencia (*Artemia*), longitud total (LT *Artemia*), producción de huevos (rotífero), tasa de conversión alimenticia (TCA), eficiencia de crecimiento individual (%EC) y velocidad de crecimiento (*Artemia*).

Las diferencias fueron aun más significativas en parámetros como el peso seco, cenizas y el valor calórico (VC) de los organismos.

La disposición del perfil bioquímico de ambas microalgas, por lo general no se correspondió con la disposición bioquímica de *Brachionus plicatilis* ni de *Artemia franciscana*; los cuales normalmente mantuvieron la composición proximal de *Proteínas* > *Lípidos* > *carbohidratos* aunque, fueron notables diferencias en el porcentaje de la fracción orgánica de cada uno de los combustibles bioquímicos, especialmente en el conjunto de los ácidos grasos ω -3 y concretamente en los ácidos grasos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) respectivamente. Estos, mostraron ser diferentes en porcentaje del total de los ácidos grasos de los organismos, ser diferentes en base a la diversidad elemental con la que fue cultivada la célula como alimento y además, demostrarse que *Brachionus plicatilis* posee la capacidad de producir *de novo* ácidos grasos de cadena aun más larga como el DHA debido a la elongación del EPA, característico de *Phaeodactylum tricornutum*.

El caso contrario ocurrió con *Artemia franciscana* debido a su marcada propensión a desenlongar ácidos grasos de cadena larga del alimento como el EPA y DHA a ácidos de cadena más corta debido a los procesos de crecimiento y reproducción.

Aquí, fue posible incrementar la concentración de los diferentes elementos independientemente, en el rotífero y *Artemia* en base a la reconstitución parcial de la formulación "ALGAL" con la que fue cultivada la microalga.

Capítulo 5

La nutrición mineral desarrollada, afectó a la cadena trófica y modificó la composición bioquímica, siendo posible esto, gracias a la variación de la complejidad y concentración de los componentes del *medio definido de cultivo* que en nuestro estudio fueron específicos para cada microalga, no tan solo para incrementar la biomasa celular, si no también para propiciar el incremento de los ácidos grasos principales o característicos de las microalgas *Phaeodactylum tricornutum* (Pt) e *Isochrysis galbana* var. T-iso (TISO) (capítulos 1 y 2). De esta forma, fue posible dar origen a dos diferentes formulaciones de cultivo sumando la totalidad de los elementos probados en concentración adecuada para cada microalga y denominados como *Algal Alto Rendimiento* para Pt y TISO (**AARPt4** y **AARTISO4** respectivamente), así como el *Algal Incremento Cantidad EPA y DHA* con diferente concentración de nutrientes **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16** (*P. tricornutum*) e **ADHA4**, **ADHA8** y **ADHA16** (*I. galbana* var. T-iso).

Capítulo 6 y 7

Se logró que la densidad celular obtenida en cultivo discontinuo y semicontinuo con las diferentes formulaciones, mostrasen diferencias y altos rendimientos en *Isochrysis galbana* var. T-iso (**AARTISO4**, **ADHA4**, **ADHA8**, y **ADHA16**) y *Phaeodactylum tricornutum* (**AARPt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16**). Así mismo, se logró generar densidades superiores dada su mayor complejidad de constituyentes con respecto a los cultivos con **AITISO4=ALGAL** y **AIPt4=ALGAL** los cuales poseen una menor complejidad elemental; e incluso obtener mejores resultados con respecto a los alcanzados con la incorporación individual en concentración óptima de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en la reconstitución parcial de la formulación de cultivo "ALGAL". Esos resultados sugirieron la existencia de un tipo de sinergismo entre todos los elementos constituyentes en concentraciones adecuadas en las nuevas formulaciones.

Del mismo modo, se demostró que parámetros celulares como el peso seco, cenizas, valor calórico (VC), composición bioquímica y otros más en cultivo semicontinuo de ambas microalgas sean diferentes entre ellas así como muy superiores en rendimiento, cuando se les cultiva con las nuevas formulaciones, especialmente en el conjunto de los ácidos grasos ω -3 y con énfasis en los ácidos grasos *docosahexaenoico* (DHA) y *eicosapentaenoico* (EPA) respectivamente; los cuales incluso con una mayor concentración de nutrientes incrementan de manera lineal su concentración en la célula.

En ambas microalgas con las nuevas formulaciones de cultivo, la incorporación celular de cada elemento fue eficiente e incluso de respuesta lineal cuando se incrementa la concentración de nutrientes hasta 8 mM. Esto revela ser una herramienta importante en el

transporte, dada la importancia fisiológica y enzimática que juegan estos elementos en los siguientes niveles tróficos.

Capítulo 8 y 9

El empleo de las formulaciones *Algal Alto Rendimiento* y *Algal Incremento* de la Cantidad de EPA y DHA con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16 mM) en el cultivo de *P. tricornutum* (**AARPt4**, **AEPA4**, **8 y 16**) e *I. galbana* var. T-iso (**AARTISO4**, **ADHA4**, **8 y 16**), produjeron diferencias en los cultivos de rotíferos y *Artemia*. Esto fue debido a la diversa composición bioquímica del alimento, lo que generó altas tasas de densidad poblacional (rotíferos), supervivencia (*Artemia*), longitud total (LT *Artemia*), producción de huevos (rotífero), tasa de conversión alimenticia (TCA), eficiencia de crecimiento individual (%EC) y velocidad de crecimiento (*Artemia*), en comparación con el mismo alimento cultivado con los medios **AIPt4=ALGAL** y **AITISO4=ALGAL**. Incluso dichos resultados superaron con mucho los obtenidos en rotíferos y *Artemia* del capítulo 3 y 4. Diferencias que fueron aun más significativas en parámetros como el peso seco, cenizas y el valor calórico (VC). Por otra parte, el perfil bioquímico celular de ambas microalgas, por lo general no se correspondió con la disposición bioquímica de *Brachionus plicatilis* ni de *Artemia franciscana*, los cuales normalmente mantuvieron la composición proximal *Proteínas* > *Lípidos* > *carbohidratos*, aunque con notables diferencias en el porcentaje de la fracción orgánica de cada uno de los combustibles bioquímicos, especialmente en el conjunto de los ácidos grasos ω -3 y con énfasis en los ácidos grasos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) respectivamente. Estos ácidos grasos tienen diferentes porcentajes del total de los ácidos grasos de los organismos y pueden ser diferentes y muy adecuados para su utilización en el siguiente nivel de la cadena trófica debido a la complejidad elemental de las formulaciones con que fue cultivada la célula como alimento. También se corrobora, que *Brachionus plicatilis* posee la capacidad de producir *de novo* ácidos grasos de cadena aun más larga como el DHA debido a la elongación del EPA, característico de *Phaeodactylum tricornutum*. El caso contrario ocurrió con *Artemia franciscana* que tiene marcada propensión a desenlongar ácidos grasos de cadena larga del alimento como el EPA y DHA a ácidos grasos de cadena más corta debido a los procesos de crecimiento y reproducción, lo que aun así no influyó en el micro crustáceo para producir las adecuadas relaciones DHA:EPA y DHA:ARA necesarias en siguientes eslabones de la cadena trófica. Así mismo, es posible incrementar en el rotífero y *Artemia* una diversidad y concentración de diferentes elementos gracias a las nuevas formulaciones con las que fueron cultivadas las microalgas como alimento de los organismos. Esto reveló que la complejidad mineral experimentada en la cadena trófica como alimento, influye tanto bioquímica como poblacionalmente en esta y que además, dada su incorporación en esos eslabones tróficos, demuestran ser un vehículo hacia estadios tempranos de desarrollo larval, debido a la importancia fisiológica y enzimática que tienen estos elementos en ese nivel trófico.

Capítulo 10

El cultivo y manipulación bioquímica de las microalgas *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. T-iso, utilizando formulaciones *Algal Alto Rendimiento* (**AARPt4**, **AARTISO4**) y *Algal Incremento* de la Cantidad EPA y DHA (**AEPA**, **ADHA**) con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16mM) produjeron una diversa **ctividad Antioxidante** y en su **contenido Polifenólico Total**. Los parámetros tienen altos índices de correlación (R^2). Lo cual indicó que el Contenido Polifenólico Total presumiblemente contribuye a la Actividad Antioxidante de estas microalgas, dada la riqueza del conjunto de los ácidos grasos ω -3 y con énfasis en la concentración de los *ácidos grasos* 20:5n-3 (EPA) y 22:6n-3 (DHA) la cual fue promovida por las nuevas formulaciones de cultivo diseñadas. La naturaleza de dichas microalgas y la herramienta biotecnológica por la cual fue posible su manipulación bioquímica, hacen de estas microalgas una importante fuente de Antioxidantes naturales sobre los cuales sería importante profundizar su exploración con diversos fines.

Capítulo 11

La manipulación bioquímica de *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana* var. T-iso, mediante el cultivo con diferentes concentraciones de minerales, con los medios definidos *Algal Alto Rendimiento* (**AARPt4**, **AARTISO4**) y *Algal Incremento* de la Cantidad EPA y DHA (**AEPA**, **ADHA**) con diferente concentración de nutrientes (4, 8 y 16 mM), produjeron en ambas células diferencias significativamente importantes con respecto a su volumen o tamaño, complejidad o granularidad y autofluorescencia de la *clorofila a* una vez analizadas por citometría de flujo. Esta es una herramienta biotecnológica importante y de aplicabilidad en la producción de alimento vivo.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Las microalgas modifican su densidad celular, productividad y composición bioquímica en función de la composición del medio de cultivo. Los nuevos elementos que se han introducido para la reformulación del medio de cultivo son: Calcio, Magnesio, Selenio y Azufre.
2. Se ha encontrado que dos formulaciones producen resultados diferentes y se han denominado: Algal Alto Rendimiento y Algal Incremento en Cantidad.
3. Las microalgas modifican su composición bioquímica en proteína, lípidos, glúcidos, minerales, ácidos grasos insaturados, actividad antioxidante y polifenoles
4. Es la formulación cualitativa y cuantitativa de los nutrientes de microalgas, la que controla la producción y composición bioquímica de las microalgas que se utilizan para la producción de rotíferos y microcrustáceos. Y es esta formulación, la responsable de la densidad de población, fisiología y composición bioquímica de esos rotíferos y microcrustáceos.
5. La especie microalgal en sí misma, tiene escasa relevancia para el control poblacional, fisiología y composición bioquímica de rotíferos y microcrustáceos.
6. Los nutrientes de las microalgas y la metodología del cultivo, son los responsables de la población, fisiología, y composición bioquímica de rotíferos y microcrustáceos en la cadena nutritiva nutrientes – microalgas – rotíferos o microcrustáceos. Las microalgas actúan como un vagón transformador y transportador.

Resumen

La importancia de un enfoque multidisciplinario en la investigación para el avance de la acuicultura, redundando en un desarrollo integrado del conocimiento desde diferentes aspectos de la biología de los organismos que se pretenden cultivar, como son la fisiología, reproducción, genética, patología y nutrición. La acuicultura moderna crece rápidamente sin embargo, su expansión, ha experimentado problemas desde etológicos, como nutricionales. La Biotecnología microalgal se plantea como una herramienta de manipulación de la cadena trófica nutrientes – microalgas – rotíferos o microcrustáceos.

Cada microalga posee necesidades específicas minerales que han de ser incluidas con respecto a la concentración óptima de nutrientes (Becker and Venkataraman, 1982, Fábregas *et al.*, 1985a, Fábregas and Herrero 1985b, Fábregas *et al.*, 1986a, Fábregas *et al.*, 1986b, Andersen, 2005).

Ahora bien es importante respondernos si la concentración de diferentes macro y microelementos por separado y en conjunto influyen en la productividad y calidad bioquímica de las microalgas, y así mismo observar como responde la calidad bioquímica de estas y la acumulación de estos elementos en concentraciones adecuadas en el siguiente nivel trófico (alimento vivo rotíferos y *Artemia*) desde el punto de vista bioquímico y del ciclo biológico de este nivel trófico.

Dicha evaluación es de relevante importancia ya que el siguiente nivel trófico de la cadena alimentaria marina, lo representan estadios larvales tempranos donde la producción de larvas tiene altas mortalidades durante la fase larvaria así como inadecuada pigmentación. Estos son problemas debidos a deficiencias en la calidad alimentaria del alimento vivo que es suministrado en esta etapa crítica.

El objetivo de este estudio fue el control de la cadena nutritiva nutrientes – microalga – rotífero o microcrustáceo

Incrementar la productividad y modificar la composición bioquímica de las microalgas ***Isochrysis galbana* var T-iso (TISO)** y ***Phaeodactylum tricornutum* (Pt)** utilizando los elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} en diferentes concentraciones sobre la base del medio de cultivo previamente diseñado (Fábregas *et al.*, 1984).

Utilizar las microalgas en las que se ha modificado la composición bioquímica, para modificar el crecimiento y supervivencia del rotífero ***Brachionus plicatilis*** y del microcrustáceo ***Artemia franciscana***.

Las microalgas incrementaron su densidad celular con diferentes elementos y con mezcla de ellos. También modificaron su composición bioquímica en peso, forma, proteína, lípidos, glúcidos, clorofila, cenizas, metales, metaloides, ácidos grasos, contenido polifenólico y capacidad antioxidante. De tal forma que diferentes medios de cultivo producen diferentes

respuestas en la composición bioquímica y así, es posible producir determinados productos más que otros dependiendo de la formulación del medio de cultivo.

La utilización de las microalgas cultivadas con diferentes formulaciones de nutrientes, modificó su composición bioquímica. Cuando estas microalgas de diferentes composición bioquímica, se les suministró como alimento al rotíferos y al microcrustáceo, se modificó significativamente la de densidad poblacional (rotíferos), supervivencia (*Artemia*), longitud total (LT *Artemia*), producción de huevos (rotífero), tasa de conversión alimenticia (TCA), eficiencia de crecimiento individual (%EC) y velocidad de crecimiento (*Artemia*), fracción orgánica y ácidos grasos insaturados de ambos.

Abstract

The culture of aquatic organisms is an emerging industrial sector, which requires great efforts to research and technological development. The importance of a multidisciplinary approach in the research, for the advancement of aquaculture, resulting in an integrated development of knowledge from different aspects of the biology of organisms that are intended to cultivate, such as physiology, reproduction, genetics, pathology and nutrition. Modern aquaculture provides effective means for intensive production of aquatic organisms under controlled conditions. Such industry with investment and rapidly growing multi-billion dollar profits (Sorgeloos *et al.*, 2001), however, its expansion has experienced severe problems from ethological, and nutrition. Even how great has been the progress, the identification of the dietary requirements of the early larval stages of many species in aquaculture is still uncertain and poorly controlled. The Microalgal Biotechnology is emerging as a tool of manipulation of the food chain for the benefit of larviculture industry.

Ocean phytoplankton, producing several hundred billion tons of dry weight per year, forms the basis of the aquatic food chain, contributing to the production of 100 million tons annually renewable resources by fishing. Therefore, it is not surprising that the microalgae components of the phytoplankton play a crucial role in the nutrition of marine organisms, especially molluscs, crustaceans and fish. In larval development laboratories is therefore necessary include a microalgae production system, and in the case of marine fish larvae, a live prey production (Muller-Feuga, *et al.*, 2003).

Microalgal metabolism given the growing conditions, involves many biochemical compounds of interest in animal nutrition, cosmetics, and pharmaceuticals (Otero, 1994, Muller-Feuga *et al.*, 2003). Metabolic plasticity allows adaptation of species to a wide range of physicochemical conditions. For example, when there is no availability of nitrogen prevents in the microalgae the synthesis of structural proteins needed for growth and division, so the metabolism is directed towards at the synthesis of carbohydrates that do not require nitrogen (polymers such as starch and polysaccharides) and important lipids such as carotenoids and fatty acids (Sukenik and Wahnnon 1991).

A more variable undoubtedly important is the nutrition and mineral balance, area little exploited in aquaculture, receiving little attention in the various stages of the nutrition of aquatic organisms via the microalgae. Where some metals and metalloids are important components of enzymes that catalyze reactions necessary for the conversion and transformation of fatty acids as well as support from oxidative damage of cell membranes and be involved these micro and microelements' in important processes such as survival, metamorphosis, growth and pigmentation at the larval stages. Each microalgae has specific needs minerals to be included and carefully calculated on the optimal concentration of nutrients (Becker and Venkataraman, 1982, Fábregas *et al.*, 1985a, 1985b Fábregas and Herrero, Fábregas *et al.*, 1986a, Fábregas *et al.*, 1986b; Andersen, 2005). The recipes for culture media currently available are not always suitable for large species, and the exact choice for a particular species depends on trial and error. It should be remembered that in the culture in general do not exist methods wrong, the culture media were developed by testing several additions, generally based on theoretical considerations. The improvement of the composition of the media, for maintenance in microalgae culture laboratory, have been

investigated for several decades, resulting in numerous recipes for different media are reported in the literature and used in different laboratories (Harrison *et al.*, 1980, Keller *et al.*, 1987, Fábregas *et al.*, 2000, Berges *et al.*, 2001; Barsanti and Gualtieri, 2006). The formulations of culture media most commonly used today in aquaculture are: Erdschreiber (Fóyn, 1934), f/2 (Guillard and Ryther, 1962), Walne, 1970, algal (Fábregas *et al.*, 1984). It is based on the above described that raises important manipulation of mineral nutrition in the microalgae as the basis of the food chain; it has been an important tool that influences the quality biochemical and biotechnological application of these. However it is important to respond if the concentration of different macro and micro elements separately and together affect the productivity and quality biochemistry of microalgae, and likewise observe how it responds these biochemical quality and the accumulation of these elements in adequate concentrations in the next trophic level (food live rotifers and *Artemia*) from the biochemical point of view and the cycle of this trophic level. Such assessment is of special importance because the next trophic level marine food chain, is represented by early larval stages where the production of larvae on a commercial scale today presents difficulties mainly high mortalities during the larval stage and poor pigmentation of the larvae, problems due to poor food quality of live food that is supplied at this critical stage.

It is therefore the objective of this study was:

To assess the improved production and biochemical microalgae *Isochrysis galbana* var. T-iso (Tiso) and *Phaeodactylum tricornutum* (Pt), by incorporating the elements Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} in different concentrations, in partial and total reconstitution of the culture medium "ALGAL" (Fábregas *et al.*, 1984) and subsequent estimation of the performance of biochemical manipulation of microalgae, in the culture and incorporation of minerals in the rotifer marine *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana*.

Chapters 1 and 2 of this dissertation, assessed the effect of the elements Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} in concentrations 0, 0.1, 1.0, 10.0 and 100.0 mM (in the case of Fe^{3+} was included the concentration 20.0 mM), in the partial reconstitution of the culture medium "ALGAL" (Fábregas *et al.*, 1984) on the generation of biomass, biochemical composition (protein, lipids, carbohydrates, fatty acid profile and other operational variables of culture) and elemental incorporation in Pt and TISO growing discontinuous culture (CD) and semicontinuous culture (CS) with renewal rate of 30%.

The cell density at the end of the CD to TISO and Pt based on the diversity and elemental concentration including in the medium "ALGAL" ranged from $65,73 \pm 3,65$ to $113,39 \pm 8,67 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$ ($p < 0,05$), with r^2 respect at the concentration of 0,75 to 0,99 and from $45,27 \pm 2,57$ to $55,84 \pm 2,48 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$ ($p < 0,05$), with an r^2 of 0,84 to 0,99 respectively, with maximum growth rates of 1,13 to $2,51 \text{ div. day}^{-1}$ and from 1,58 to $2,50 \text{ div. day}^{-1}$ comparatively. While in CS a cell density of $52,85 \pm 4,28$ to $100,33 \pm 5,86 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$ ($p < 0,05$), and $22,40 \pm 1,60$ to $51,31 \pm 3,30 \times 10^6 \text{ cel. mL}^{-1}$ ($p < 0,05$) respectively, with cellular productivity of 15,85 to $30,11 \times 10^9 \text{ cél. L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ and 6,36 to $15,69 \times 10^9 \text{ cél. L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ comparatively. Existing residual nitrogen values around 0 to 3,37mM for conditions with TISO, and of 0 to 3,32 for Pt. The maximum values (pg. cel^{-1}) Q_N (0,62 to 1,06 TISO/Pt from 0,88 to 1,35 ($p < 0.05$)) and Q_C (6,23 to 11,06 TISO/Pt from 6,53 to 9,77 ($p < 0.05$)) coincided with the optimal concentration of the element in TISO (Mg^{2+} [10,0], Ca^{2+} [10,0],

$\text{Si}^{4+}[1,0]$, $\text{Se}^{2-}[1,0]$, $\text{Fe}^{3+}[20,0]$, $\text{S}^{2-}[0,1]$, $\text{Zn}^{2+}[1,0]$ y $\text{Cu}^{2+}[1,0]$) y Pt ($\text{Mg}^{2+}[1,0]$, $\text{Ca}^{2+}[1,0]$, $\text{Si}^{4+}[1,0]$, $\text{Se}^{2-}[1,0]$, $\text{Fe}^{3+}[20,0]$, $\text{S}^{2-}[0,1]$, $\text{Zn}^{2+}[0,1]$ y $\text{Cu}^{2+}[0,1]$) in biomass generation. With respect to the C:N is stabilized between 9,27 and 7,0 with TISO and 6-7 with Pt. The protein content with TISO in the organic fraction (FO) ranged between 22,54 to 55,47% ($p < 0.05$), while with Pt between 16,79 to 68,81% ($p < 0.05$), while the content of lipids and carbohydrates (FO Tiso and Pt) was found in 18,51 to 38,13% and 22,26 to 51,54% ($p < 0.05$), 17,25-56,33% and 10,47 to 47,83% ($p < 0.05$) respectively. Results that showed an caloric value ($10^{-7} \text{ J.cél}^{-1}$) from 1,53 to 3,90 and from 1,81 to 5,13 for TISO and Pt respectively. The dry weight (pg.cél^{-1}) of TISO and Pt with respect mineral diversity and concentration with were cultured the cells, revealed values in the range of 6,90 to 16,96 ($p < 0.05$) and 7,78 to 22,46 ($p < 0.05$) respectively, with high positive correlation coefficients $r^2=0,94$, 0,99-TISO, $r^2=0,80$, 0,99-Pt with different linear and polynomial trend. Similarly, the cellular content of ash (pg.cél^{-1}) proved to be dissimilar, based on the employee element with values ranging from 1,04 to 3,44 TISO ($r^2=0,92$ to 0,99) ($p < 0,05$) and Pt 1,71 to 4,51 ($r^2=0,80$ to 0,99) ($p < 0,05$). The incorporation in CS of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} in TISO and Pt was very efficient according to the increase in concentration ($p < 0.05$) in both cases, high positive correlation coefficients $r^2=0,74$ to 0,99-TISO, $r^2=0,79$ to 0,96-Pt, with dissimilar linear and polynomial trend. The decrease in organic content cellular in both microalgae was offset by an increase of element content in the ashes as they increase the concentration of this, about Rebolloso Fuentes *et al.*, 2000 mentioned that if the minerals are bioavailable, non-toxic or antinutritional, physiologically and nutritionally will be used by cells in proper balance of its concentration (Carvalho *et al.*, 2006). The cellular analysis of the fatty acids (FA) showed that the quality and quantity of them (%) depended of the element and its concentration ($p < 0.05$), where the principal FA in TISO the 22:6(n-3) was highest with: $\text{Mg}^{2+}[1,0]$ -5,83%, $\text{Ca}^{2+}[1,0]$ -3,92%, $\text{Si}^{4+}[1,0]$ -0,95%, $\text{Se}^{2-}[0,1]$ -5,36, $\text{Fe}^{3+}[20,0]$ -10,06%, $\text{S}^{2-}[1,0]$ -12,60%, $\text{Zn}^{2+}[1,0]$ -8,81% y $\text{Cu}^{2+}[1,0]$ -9,44%; whereas with Pt 20:5(n-3) showed a peak with: $\text{Mg}^{2+}[1,0]$ -15,08%, $\text{Ca}^{2+}[1,0]$ -7,50%, $\text{Si}^{4+}[1,0]$ -9,33%, $\text{Se}^{2-}[0,1]$ -7,61, $\text{Fe}^{3+}[20,0]$ -10,58%, $\text{S}^{2-}[1,0]$ -14,01%, $\text{Zn}^{2+}[0,1]$ -10,12% y $\text{Cu}^{2+}[0,1]$ -11,87%; such elements in optimal concentration en the culture medium "ALGAL" (Fábregas *et al.*, 1984) showed us how versatile it is often TISO and Pt in lipid metabolism and thus induce the amount of major fatty acids (FA); where the decrease FAsaturated ($p < 0.05$) more FAmoinsaturated ($p < 0.05$) corresponded with increase of FApoliinsaturated ($p < 0.05$) with that optimal concentration elemental, with which it was also possible to change the ratio of AG ω -3: ω -6 in TISO between 1,71-15,89:1% ($p < 0.05$) and 2,98-8,10:1% ($p < 0.05$) in Pt, and shows both microalgae with respect to the elemental concentration high levels of correlation r^2 (0,31 to 0,97-TISO, 0,63-0,86-Pt) with different linear and polynomial trend. As for the ratio EPA:ARA based on the element and concentration in the formulation of culture "ALGAL" we increase this proportion in the range of 1,16:1% to 11,28:1% ($p < 0,05$) by cell TISO, meanwhile that with Pt between 5,2:1% to 15,47:1% ($p < 0,05$) ($r^2=0,67$ y 0,95 respectively). In TISO respect to the ratio DHA:EPA were found highly significant differences ($p=0.001$) between the experimental conditions ($p < 0.05$) with values 5,1-23,39:1%, with high correlation coefficients r^2 between 0,53 to 0,96 with the elemental

concentration; while the proportion of *DHA:ARA* was able manipulated between 4,21:1% to 67,07:1% ($p<0.05$), with high correlation coefficients between 0,62 to 0,96.

In **chapter 3 and 4** was analyzed the performance of biochemical manipulation of the already mentioned microalgae, in the culture, proximate composition and incorporation of minerals of marine rotifer *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana*.

Where *Brachionus plicatilis* fed with Pt and TISO cultivated with optimal concentrations of Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} in the formulation "ALGAL" for maximum cell production, produced an population density of between 211 and 313 rotifers.mL⁻¹ ($p<0.05$) and 225-302 rotifers.mL⁻¹ ($p<0.05$) respectively, while with Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} ranged between 137 and 207 rotifers.mL⁻¹ ($p<0,05$) and 246-325 rotifers.mL⁻¹ ($p<0.05$), results indicate that the quality of food via the mineral nutrition is the affecting the aforementioned generation population.

Moreover, the final production of eggs.mL⁻¹ in the case of iron, copper, sulphur and zinc ranged from 45 to 119 eggs.mL⁻¹ ($p<0.05$ Pt), 50 and 96 eggs.mL⁻¹ ($p<0.05$ TISO) which corresponded to 0,21 and 0,38 eggs.female⁻¹ (Pt), 0,27 and 0,54 eggs.female⁻¹ respectively, while for magnesium, calcium, silicon and selenium fluctuated between 55 and 190 eggs.mL⁻¹ ($p<0.05$ Pt), 46 and 83 eggs.mL⁻¹ ($p<0.05$ TISO) that pertained to 0,38 and 0,80 eggs.female⁻¹ and 0,37 to 0,48 eggs.female⁻¹ comparatively. Reason for circadian rhythm 12L:12O to which they were subjected rotifers cultures, we observed a great uniformity of size, likewise a large number of females, at early in the cycle of light showed between 3 and 5 eggs. Values were as follows population growth rate (r) for rotifers fed with Pt and TISO enriched with optimal concentration of Mg^{2+} -0,14, Ca^{2+} -0,13, Si^{4+} -0,17, Se^{2-} -0,18 día⁻¹ ($p<0,05$), Mg^{2+} -0,22, Ca^{2+} -0,23, Si^{4+} -0,23, Se^{2-} -0,22 día⁻¹ respectively; while that with Fe^{3+} -0,20, Cu^{2+} -0,23, S^{2-} -0,23 y Zn^{2+} -0,22 día⁻¹, Fe^{3+} -0,22, Cu^{2+} -0,22, S^{2-} -0,21 y Zn^{2+} -0,20 día⁻¹ comparatively. Regarding the food conversion ratio (FCR $p<0.05$) and percentage of growth efficiency (%EG $p<0.05$) by the rotifer, was very variable with Pt (magnesium (0,94-104%), calcium (1,06-94%), silicon (1,03-97%), selenium (1,42-70%), iron (1,90-52%), copper (1,63-61%), sulphur (1,85-54%), zinc (1,73-58%)) and TISO (magnesium (1,60-62%), calcium (1,49-67%), silicon (1,61-62%), selenium (1,36-74%), iron (1,97-51%), copper (1,50-66%), sulphur (1,37-73%), zinc (1,98-50%)). In order of importance energy, the content of protein in the rotifer (ng.rotífer⁻¹) was the major biochemical fuel once cultivated microalgae, and known concentrations of Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , with values between 218,99 and 308,56 ng.rotífer⁻¹ ($p<0.05$) for Pt and 173,12 to 195,86 ng.rotífer⁻¹ ($p<0.05$) for TISO, whereas with Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} was 155,51-202,32 ng.rotífer⁻¹ ($p<0,05$) for Pt and 168,29-255,55 ng.rotífer⁻¹ ($p<0,05$) for TISO. The second fuel is accounted for lipid content that with Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} was between 134,61 and 252,70 ng.rotífer⁻¹ ($p<0.05$) for Pt and from 47,44 to 60,07 ng.rotífer⁻¹ ($p<0.05$) for TISO, in regard to treatment with Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} , the analysis showed values of 74,24 to 111,37 ng.rotífer⁻¹ ($p<0,05$) for Pt, and between 50,97 to 60,81 ng.rotífer⁻¹ ($p<0,05$) for TISO. Carbohydrates in the rotifer revealed on based elements Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} content around 76,98 and 126,70 ng.rotífer⁻¹ ($p<0.05$) for Pt, and 31,98 to 41,40 ng.rotífer⁻¹ ($p<0,05$) for TISO, likewise treatments with Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} indicated values ranging from 51,08 to 86,31 ng.rotífer⁻¹ ($p<0,05$) for Pt and from 32,97 to 40,44 ng.rotífer⁻¹ ($p<0,05$) for TISO. The biochemical composition produced a calorific value (CV) with Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} around

115,94 and 182,86 $\times 10^{-7}$ J.rotífer⁻¹ ($p < 0,05$) for Pt and 62,49 and 77,75 $\times 10^{-7}$ J.rotífer⁻¹ ($p < 0,05$), whereas with Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, y S²⁻ results that ranged from 74,51 to 107,22 $\times 10^{-7}$ J.rotífer⁻¹ ($p < 0,05$) with feeding based in Pt and ranged from 65,52 to 93,23 $\times 10^{-7}$ J.rotífer⁻¹ ($p < 0,05$) based diet TISO. *Brachionus plicatilis* diversity based on elemental (Mg²⁺, Ca²⁺, Si⁴⁺, Se²⁻) with which your food was culture, revealed a dry weight around 426,62 and 654,05 ng.rotífer⁻¹ ($p < 0,05$) with Pt and 249,68 to 308,18 ng.rotífer⁻¹ ($p < 0,05$) with TISO, so that with Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, y S²⁻ values were 286,78 and 414,61 ng.rotífer⁻¹ ($p < 0,05$) with Pt and 257,87 to 374,05 ng.rotífer⁻¹ ($p < 0,05$) with TISO. The dry weight of one rotifer is highly variable in the literature, is commonly found values between 300 and 600 ng, so it is clear that based on food quality via the concentration of the elements tested in this study, which had an effect on the variation of rotifer dry weight. As for the ash content of rotifer, varied with respect to the element tested, so that with Ca²⁺, Mg²⁺, Se²⁻, Si⁴⁺ showed an range of oscillation between 8,36 and 19,73 ng.rotífer⁻¹ ($p < 0,05$) with Pt and with TISO between 8,16 and 10,85 ng.rotífer⁻¹ ($p < 0,05$), with Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, y S²⁻ containing rotifers showed 9,56 to 14,60 ng.rotífer⁻¹ ($p < 0,05$) y 8,77 to 12,99 ng.rotífer⁻¹ ($p < 0,05$) with Pt and TISO respectively. The incorporation independent of Mg²⁺, Ca²⁺, Si⁴⁺, Se²⁻, Fe³⁺, S²⁻, Zn²⁺ y Cu²⁺ by *Brachionus plicatilis* via Pt and TISO was efficient and statistically different ($p < 0,05$) of organisms in which the diet was not cultivated with these elements. Usually little attention has been paid to the mineral nutrition of aquatic organisms, some authors do not consider it a key determinant of nutritive value of diet, though the form and concentration that provided an element given its importance in physiological processes, metamorphic and survival is of crucial importance in their bioaccumulation through the food chain. The content of fatty acids (FA) in *Brachionus plicatilis* showed the same trend as microalgae Pt and TISO cultured with different concentrations of elements, where the principal FA of rotifer fed with TISO the 22:6 (n-3) ($p < 0,05$) was Mg²⁺[10,0]-5,66%, Ca²⁺[10,0]-5,20%, Si⁴⁺[1,0]-4,43%, Se²⁻[1,0]-4,40%, Fe³⁺[20,0]-7,50%, S²⁻[0,1]-4,68%, Zn²⁺[1,0]-5,13% and Cu²⁺[1,0]-6,03%; while with Pt the 20:5(n-3) ($p < 0,05$) showed values of Mg²⁺[1,0]-8,73%, Ca²⁺[1,0]-8,99%, Si⁴⁺[1,0]-9,73%, Se²⁻[1,0]-9,02, Fe³⁺[20,0]-8,66%, S²⁻[0,1]-10,52%, Zn²⁺[0,1]-8,09% y Cu²⁺[0,1]-9,27%. It was clear that the provision of the medium of culture of microalgae brings a great variability in their total lipids as well as the FA, specially the DHA and EPA. With the elemental concentration was also possible to change the ratio of FA ω -3: ω -6 in rotifers fed with TISO between 1,04:1 to 1,87:1% ($p < 0,05$), reason that with Pt revealed twice the efficiency around 2,24:1 to 4,32:1% ($p < 0,05$). With regard to the ratio DHA:ARA(TISO) and EPA:ARA(Pt) in the rotifer we change those ratios in the range of the 0,77:1% to 1,58:1% ($p < 0,05$) with TISO, while with Pt between 7,79:1% to 19,98:1% ($p < 0,05$). Concerning at the proportion DHA:EPA in rotifers fed with TISO was found highly significant differences ($p = 0,001$) between the experimental conditions elemental ($p < 0,05$) with values of 5,50:1 to 12,28:1%. As regards the rotifers fed Pt the FA docosahexaenoic acid (DHA 22:6 n-3) was present in the range of 1,02 to 1,45% of total FA, the presence of this FA is resulted of the desaturation and elongation of FA 22:5n-3 (docosapentaenoic) which showed a higher concentration respect at that of DHA in the range of 1,03 to 2,34%. In regard to the performance of the diets microalgae in *Artemia franciscana*, the survival of *Artemia*+Pt and *Artemia*+TISO at T₁₀₋₁₁ and T₉ days of culture

respectively, with the conditions Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} indicated values between 66 and 83% ($p < 0.05$) for Pt and between 67 and 75% with TISO ($p < 0.05$), whereas with Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , γS^{2-} round score of 73 and 93% with Pt ($p < 0.05$), as with TISO 72 to 98% ($p < 0.05$). The total length (TL) achieved by adults of different treatments was observed with magnesium, calcium, silicon and selenium around 6,16 and 6,81 mm^{-1} for organism ($p < 0,05$) with Pt 4,44 and 4,71 mm^{-1} for organism with TISO, whereas with Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , γS^{2-} dimensions of 6,04 to 9,33 mm^{-1} by adult for *Artemia* ($p < 0.05$) con Pt γ 3,46 to 5,20 by adult for *Artemia* ($p < 0.05$) con TISO. As these organisms showed a feed conversion rate (FCR) and percentage of growth efficiency (%EG) with magnesium (3,45-29,01%), calcium (2,48-40,35%), silicon (2,75-36,31%), selenium (3,06-32,69%) ($p < 0.05$), while with TISO magnesium (2,96-33,71%), calcium (1,87-53,39%), silicon (3,07-32,48%), selenium (1,67-60,02%) ($p < 0.05$), while with Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , γS^{2-} (4,48-22,31%), (3,44-29,07%), (2,28-43,70%), (1,84-54,20%) ($p < 0.05$) respectively for Pt and TISO (2,74-36,40%), (1,71-58,46%), (1,37-72,95%) γ (2,75-36,37%) comparatively. The behaviour of the above variables gives us an idea of how important certain elements in the quality of food via food chain. The quality of the microalgae due to the enrichment with different elements in known concentrations, showed different growth rates (RG) in *Artemia* ($mm.day^{-1}$): magnesium-0,57, calcium-0,61, Si-0,59, Se-0,62 ($p < 0,05$) with Pt, and magnesium-0,52, calcium-0,52, Si-0,51, selenium-0,50 with TISO, however *Artemia*+Pt showed with iron-0,72, copper-0,84, zinc-0,72, sulfur-0,63 ($p < 0.05$), while *Artemia*+TISO expressed with iron-0,46, copper-0,58, zinc-0,44, sulphur-0,48 ($p < 0.05$). The dry weight gained by adult *Artemia franciscana* based on the element in the diet, was highly variable so that with magnesium, calcium, silicon, selenium varied in the range of 139,19 to 261,41 $\mu g.artemia^{-1}$ ($p < 0.05$) with Pt, moreover TISO ranged between 126,69 to 183,04 $\mu g.artemia^{-1}$ ($p < 0.05$). Greater fluctuations were evident with iron, copper, sulphur, zinc resulting from 173,72 to 348,16 $\mu g.artemia^{-1}$ ($p < 0.05$) with Pt, as well as in TISO with values between 105,58 and 200,09 $\mu g.artemia^{-1}$ ($p < 0.05$). As for the ash content of adult *Artemia* varied with respect to the enrichment of element in the microalgae, so that with magnesium, calcium, silicon, selenium showed a range of oscillation between 8,00 and 17,74 $\mu g.artemia^{-1}$ ($p < 0.05$) with Pt and with TISO between 7,28 and 10,91 $\mu g.artemia^{-1}$ ($p < 0.05$), likewise oscillating with iron, copper, sulphur, zinc around 10,14 and 20,01 $\mu g.artemia^{-1}$ ($p < 0.05$) with the diatom and the haptophytes between 6,07 and 11,15 $\mu g.artemia^{-1}$ ($p < 0.05$). Incorporating independent Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} γ Cu^{2+} by *Artemia franciscana* via Pt and TISO was efficient and statistically different ($p < 0.05$) of organisms in which the diet was not cultivated with these elements. Such differences are consistent with the reported variability of ash in all elementary conditions, which are also evident in the behaviour of the dry weight and organic of *Artemia* via the food. The protein content of *Artemia* adults with conditions Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} reported values of 101,09, 141,21, 125,83, 103,26 $\mu g.artemia^{-1}$ ($p < 0,05$) respectively with Pt, while with TISO 78,96, 92,77, 77,02, 105,48 $\mu g.artemia^{-1}$ ($p < 0.05$) correspondingly, while iron, copper, sulphur, zinc values around at 113,02, 109,70, 124,89, 232,02 $\mu g.artemia^{-1}$ ($p < 0,05$) for Pt and 51,66, 76,83, 122,59, 54,47 $\mu g.artemia^{-1}$ ($p < 0,05$) for TISO. While lipid treatments Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} via Pt revealed 40,93, 68,76, 55,34, 36,91 $\mu g.artemia^{-1}$ ($p < 0,05$) and via TISO 32,55, 41,09, 41,31, 37,50 $\mu g.artemia^{-1}$

($p < 0,05$), same values and aligning with the conditions Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} expressing results of 32,31, 30,08, 66,98 and 65,11 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ ($p < 0,05$) correspondingly with Pt, in regard to TISO around 26,31, 50,50, 36,82 and 26,66 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ ($p < 0,05$). The carbohydrate content indicated that with Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} via Pt values of 23,78, 34,11, 34,31 and 26,01 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ ($p < 0,05$), in both with TISO 30,72, 35,69, 31,09 and 29,15 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ ($p < 0,05$), and when employment Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} content of 26,60, 26,17, 40,85 and 31,02 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ ($p < 0,05$) with Pt, likewise 22,44, 28,73, 29,54 and 21,80 $\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ ($p < 0,05$) using TISO. The biochemical composition produced a calorific value (CV) with Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} around 3,46 and $6,69 \times 10^{-6} \text{J}.\text{artemia}^{-1}$ ($p < 0,05$) using Pt, and likewise using TISO values TISO from 3,14 to $4,51 \times 10^{-6} \text{J}.\text{artemia}^{-1}$ ($p < 0,05$). As with Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} an VC from 4,26 to $8,66 \times 10^{-6} \text{J}.\text{artemia}^{-1}$ ($p < 0,05$) with Pt and of 2,60 to $4,90 \times 10^{-6} \text{J}.\text{artemia}^{-1}$ ($p < 0,05$) with TISO. Regarding the content of fatty acids in *Artemia franciscana*, this was modulated by the quality of Pt and TISO enriched with different concentrations of elements, where the principal FA in adults of *Artemia* fed with Pt the 20:5(n-3) ($p < 0,05$) percentage was found with the following values: $\text{Mg}^{2+}[1,0]$ -5,71%, $\text{Ca}^{2+}[1,0]$ -7,45%, $\text{Si}^{4+}[1,0]$ -4,96%, $\text{Se}^{2-}[0,1]$ -5,54%, $\text{Fe}^{3+}[20,0]$ -6,34%, $\text{S}^{2-}[1,0]$ -8,29%, $\text{Zn}^{2+}[0,1]$ -9,56% y $\text{Cu}^{2+}[0,1]$ -6,54%; while with TISO the 22:6(n-3) ($p < 0,05$) expressed the following values: $\text{Mg}^{2+}[1,0]$ -0,48%, $\text{Ca}^{2+}[1,0]$ -0,58%, $\text{Si}^{4+}[1,0]$ -0,63%, $\text{Se}^{2-}[0,1]$ -0,54%, $\text{Fe}^{3+}[20,0]$ -0,67%, $\text{S}^{2-}[1,0]$ -0,82%, $\text{Zn}^{2+}[1,0]$ -1,07% y $\text{Cu}^{2+}[1,0]$ -0,74%. Indicate that the percentage content of DHA and EPA in microalgae diet enriched with the elements and concentrations described above, in all cases was above percentage values found in *Artemia* when fed such diets, this decrease is due to this microcrustaceans has a strong propensity to retroconversion long chain fatty acids to short (Evjemo *et al.*, 1997, Navarro *et al.*, 1999) both in quantity and quality, depending on the time of enrichment or food, which we indicate that employees in processes of growth and sexual maturation, which are indicative of the values described as FCR and %GE. It was therefore clear, that the constitution of the culture medium of the microalgae, brings a great variability in their lipids as well as the FA specifically of EPA and DHA. With such quality microalgae given by the elemental concentration is that it was also possible to change the ratio of the FA ω -3: ω -6 in *Artemia*+Pt between 1,89:1 and 8,49:1% ($p < 0,05$), reason with *Artemia*+TISO revealed to be almost three times lower efficiency around 1,23:1 to 2,92:1% ($p < 0,05$). With regard to the ratio EPA:ARA (Pt) and DHA:ARA (TISO) in *Artemia franciscana* given by the quality microalgae due to enrichment with different concentrations of Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} y Se^{2-} is that we change those ratios in the range of 5,72:1% to 43,92:1% ($p < 0,05$) with Pt, while with TISO between 1,06:1% to 1.58:1% ($p < 0,05$). Concerning to the ratio DHA:EPA in *Artemia* fed with TISO, differences were highly significant ($p = 0,001$) between the elementary experimental conditions ($p < 0,05$) with values of 0,67:1 to 2,07%. It is based on the results obtained in previous chapters, that in **Chapter 5** shows the possibility of integrating the different macro and micronutrients in balance and reconstitution of the culture medium "ALGAL (Fábregas *et al.*, 1984), taking into account the importance of those elements in different physiological processes needed at the cellular level, which triggered changes in the fatty acid profile of the microalgae tested, so it is possible to manipulate them within certain limits, either on your metabolism, modulating microalgae growth parameters

or correlation between the components of culture medium (Carvalho *et al.*, 2006). Mineral nutrition and its effects on the change in the composition of culture medium on fatty acid production and cell biomass is feasible, by including in the culture medium of the elements already mentioned, which in addition to the cells with physiological functions, are instrumental in the biochemical quality of them and these in turn function as a vehicle for transporting the this elements to the following trophic levels. Behaviours similar to those reported in Chapter 1 and 2 of this dissertation, with respect to the amount of fatty acids have been expressed by Feng *et al.*, 2005, which concluded that the addition in the culture medium of organic and inorganic molecules improves the production of lipids and polyunsaturated fatty acids in microalgae. Considering the above, is that it gave rise to two different types of growth media for optimal generation of cell density, which is called Algal High Performance *Isochrysis galbana* var. TISO (AHPTISO) and Algal High Performance *Phaeodactylum tricornutum* (AHPt), which were designed by reconstituting the culture medium "Industrial Algal" with elemental concentrations previously described as optimal. Such culture media were prepared at a concentration of NaNO_3 4mM. At the same time also originated two other types of culture medium for maximum production of eicosapentaenoic polyunsaturated fatty acid 20:5 (n-3 EPA) and docosahexaenoic 22:6 (n-3 DHA), in the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Isochrysis galbana* var. T-iso and is called Algal-Increasing Amount of EPA (AEPA) and DHA (ADHA), both culture media were created based on the reconstitution of the culture medium "Industrial Algal" (IA) with elemental concentrations optimum described above. Such culture media were prepared and tested at a concentration 4, 8 and 16 mM of NaNO_3 . In **Chapter 6 and 7** in order to further improve the performance, proximate composition and incorporation of elements in *Isochrysis galbana* var. T-iso (TISO) and *Phaeodactylum tricornutum* (Pt). Were tested this culture formulations IATISO4, IAPt4, AHPTISO4, AHPt4, ADHA4, 8, 16 and AEPA4, 8 16, which were designed based on the results of Chapter 1 and 2 in Chapter 5. The cell density obtained at the end of the CD (10^6cel.mL^{-1}) with the new formulations was as follows: IATISO4 ($70,40 \pm 7,61$), AHPTISO4 ($83,75 \pm 5,98$), ADHA4 ($84,40 \pm 6,90$), ADHA8 ($140,25 \pm 13,89$), ADHA16 ($162,25 \pm 13,89$) ($p < 0,05$), with an r^2 of 0,94 adjusted positive linear in the generation of biomass with TISO with the formulation ADHA, while with Pt was achieved densities of AIPt4 ($52,50 \pm 4,10$), AHPt4 ($64,00 \pm 5,70$), AEPA4 ($69,30 \pm 5,65$), AEPA8 ($81,25 \pm 7,65$) and AEPA16 ($98,25 \pm 8,60$) ($p < 0,05$), with an r^2 of 0,98 adjusted positive linear in the generation of biomass to the formulation AEPA. With maximum growth rates for TISO of 1,96, 2,10, 2,54, 2,37 y 2,31 div.day^{-1} respectively, while with Pt of 0,94, 1,15, 1,17, 1,52 y 1,48 div.day^{-1} comparatively. The cell density in CS (10^6cel.mL^{-1}) ($p < 0,05$) over the CD for each medium tested, showed differences with the renewal rate of 30%, so that mediums as IATISO4, ADHA8 and ADHA16 concentration decreased an 28 ($51,85 \pm 8,59$), 22 ($107,55 \pm 10,10$) and 65% ($57,08 \pm 4,74$) respectively, while formulations AHPTISO4 and ADHA4 even increased its cellular concentration an 11 ($94,72 \pm 4,31$) and 6% ($91,85 \pm 8,30$) comparatively, reaching steady state at day 32 of culture. While formulations IAPt4 and AHPt4 decreased your concentration an 13,14 ($45,60 \pm 4,80$) and 21,72% ($50,10 \pm 4,20$) respectively, likewise formulations AEPA4, AEPA8 and AEPA16 reduce its cellular concentration an 30,22 ($48,36 \pm 3,70$), 12,86 ($70,80 \pm 6,90$) and 30,18 ($68,60 \pm 6,30$)

comparatively, reaching steady state at day 30 of culture; highly significant differences exist ($p=0,001$) between culture conditions ($p<0,05$). Representing a cell productivity ($10^9 \text{cél.L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$) of 15,5(**AITISO4**), 28,42(**AARTISO4**), 27,55(**ADHA4**), 32,26(**ADHA8**) y 17,12(**ADHA16**) ($p<0,05$) with TISO, and of 13,68(**AIpt4**), 15,03(**AARpt4**), 14,51(**AEPA4**), 21,24(**AEPA8**) y 20,58(**AEPA16**) ($p<0,05$) with Pt. Existing residual nitrogen values [mM] of 0,83(**AITISO4**), 0,23(**AARTISO4**), 0,25(**ADHA4**), 0,31(**ADHA8**), 0,50(**ADHA16**) with TISO, and with Pt of 0,16(**AIpt4**), 0,11(**AARpt4**), 0,12(**AEPA4**), 0,31(**AEPA8**), 0,99(**AEPA16**). Showed the following values of Q_N y Q_C (pg.cél^{-1}), for microalgae with different media tested of **IATISO4** (0,49-3,32), **AHPTISO4** (1,08-12,99), **ADHA4** (0,63-8,16), **ADHA8** (0,93-7,18), **ADHA16** (1,68-9,77) ($p<0,05$) for TISO and of **IAPt4** (1,23-13,03), **AHPpt4** (1,28-13,69), **AEPA4** (1,29-12,84), **AEPA8** (1,61-12,63), **AEPA16** (2,91-15,46) ($p<0,05$) for Pt. Based on previous results, obtained the following ratio C:N for TISO with different culture media **IATISO4** (5,78), **AHPTISO4** (10,28), **ADHA4** (11,05), **ADHA8** (6,64), **ADHA16** (4,98), likewise for Pt with **IAPt4** (9,09), **AARpt4** (9,20), **AEPA4** (8,52), **AEPA8** (6,72), **AEPA16** (4,55), values that indicated the existence of an optimal (Redfield ratio C:N=6,6) with respect to the concentration of nitrogen and elemental ingredients in the formulation of culture. The structure of cellular biochemistry (pg.cél^{-1}) of TISO and Pt, varied considerably, proteins (3,87 to 11,28-TISO and 5,08 to 15,94-Pt), carbohydrates (2,98 to 7,62-TISO and 2,32 to 8,29-Pt) and lipids (4,00 to 8,62-TISO and 5,76 to 11,56-Pt) with respect to the formulations employed and concentration [mM] of those, exist in the behavior of the three fuels biochemical highly significant differences ($p=0,001$) between culture conditions ($p<0,05$). While the culture media with ADHA and AEPA in nutrient concentrations 4, 8 and 16 mM the evolution of protein content showed a correlation coefficient of r^2 of 0,92 and 0,95 correspondingly (adjusted to a linear trend positive) derived from Q_N , while with regard to carbohydrates an $r^2=0,85$ and 0,99, respectively (adjusted to a linear trend positive) derived from Q_C , and in the case of lipids an r^2 of 0,91 and 0,99 (adjusted to a linear trend positive). Showed results proximal with different formulations **AHPTISO4**, **ADHA4**, **ADHA8** and **ADHA16** an VC in the range of $4,17-6,73 \times 10^{-7} \text{ J.cél}^{-1}$ ($p<0,05$) with respect at medium **IATISO4=ALGAL** ($3,02 \times 10^{-7} \text{ J.cél}^{-1}$) with TISO, while with the formulations **AHPpt4**, **AEPA4**, **AEPA8** and **AEPA16** an VC higher in the range of $7,05-9,04 \times 10^{-7} \text{ J.cél}^{-1}$ ($p<0,05$) and respect of medium **IAPt4=ALGAL** ($3,90 \times 10^{-7} \text{ J.cél}^{-1}$). There was variation in the cell dry weight in TISO with the formulations **AHPTISO4**, **ADHA4**, **ADHA8** and **ADHA16** in the range of 20,02 to 30,06 pg.cél^{-1} ($p<0,05$), showing generate greater weight with respect to medium **IATISO4=ALGAL** with 12,82 pg.cél^{-1} . While with Pt and the medium **AHPpt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16** indicated values around 29,77 to 38,40 pg.cél^{-1} ($p<0,05$) results above 15,62 pg.cél^{-1} obtained with **IAPt4=ALGAL**. Note also that with the culture media ADHA and AEPA with different concentration of nutrients (4, 8 y 16mM) produced in the cells an increased linear of cell dry weight with positives linear correlation coefficients r^2 of 0,91 and 0,92 respectively. The cellular content of ash (pg.cél^{-1}) shown to be dissimilar in based at the different formulations of culture in the microalgae, where TISO with **AHPTISO4**, **ADHA4**, **ADHA8** and **ADHA16** accumulated a higher ash content in the range of 3,86 to 6,61 pg.cél^{-1} ($p<0,05$) compared to the culture medium **IATISO4=ALGAL** with 1,97 pg.cél^{-1} . In addition to Pt with **AHPpt4**,

AEPA4, AEPA8 and AEPA16 produced an ash storage in the range of 4,75 to 5,88 pg.cel^{-1} ($p<0.05$) compared with culture medium IAPt=ALGAL with 2,46 pg.cel^{-1} . Where the culture conditions ADHA and AEPA with different concentrations of nutrients (4, 8 y 16mM) produced in the cells an linear increase of ash with a r^2 of 0,87 and 0,94 respectively. The cellular incorporation in semicontinuous culture of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2-} , Si^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y S^{2-} for TISO and Pt based on different culture media tested, told us the existence of highly significant differences ($p=0,001$) between the conditions experienced ($p<0.05$). Mentioning the case of culture media ADHA and AEPA with different concentration of nutrients (4, 8 y 16mM) were obtained high correlation coefficients in the cellular incorporation of these elements. The cellular analysis of fatty acids (FA) in the microalgae's, showed that the quality and quantity of them (%), depended on the different formulations of culture ($p<0.05$), where the principal FA in TISO 22:6(n-3) showed with IATISO4=ALGAL-6,68%, AHPTISO4-9,68%, ADHA4-6,93%, ADHA8-7,63% and ADHA16-8,35%, while with Pt the principal FA 20:5(n-3) indicates with IAPt4=ALGAL-6,88%, AHPt4-9,99%, AEPA4-8,19%, AEPA8-11,74% and AEPA16-12,56%. Such culture media told us how versatile it is often TISO and Pt in the metabolism of yours lipids and thereby induced the amount of your major fatty acids. Marked differences were found in the percentage content and pg.cel^{-1} of this saturated fatty acids (SFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) of the microalgae studied, existing in all cases highly significant differences ($p=0,001$) between the culture conditions experienced ($p<0.05$). Noted that in the case of culture media ADHA and AEPA with different concentrations of nutrients (4, 8 and 16mm) the evolution of these fatty acids expressed correlation coefficients $r^2=0,94$ (PUFA), 0,90 (SFA), 0,98 (MUFA) with TISO and $r^2=0,98$ (PUFA), 1,0 (SFA), 0,99 (MUFA) with Pt; adjusting to a positive linear trend in the 1st case and negative in the 2nd and 3er case. With such diversity of formulations of culture was possible to alter the proportion of FA ω -3: ω -6 in TISO between 0,90-2,61:1% ($p<0,05$) and 4,28-11,10:1% ($p<0,05$) in Pt. As related to the ratio EPA:ARA based on different culture media tested in the microalgae studied we increase this proportion in the range of the 0,31:1% to 1,54:1% ($p<0,05$) per cell in TISO, meanwhile that with Pt between 11,46:1% to 39,0:1% ($p<0,05$). The percentage share cellular of the FA DHA:ARA with the different culture media in TISO was found between 10,19:1% to 23,90:1% with the formulations AHPTISO4, ADHA4, ADHA8 and ADHA16 results over found in **IATISO4=ALGAL** con 4,12:1%. The percentage share of the FA DHA:EPA with the media AHPTISO4, ADHA4, ADHA8 and ADHA16 was among 18,61:1% y 37,95:1% with respect to the media IATISO4=ALGAL with an value of 13,36:1%.

In the **Chapters 8 and 9** in order to improve the quality biochemistry and mineral incorporation in *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana*, are culture with the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Isochrysis galbana* var. T-iso, which were manipulated biochemically with different formulations. Where *Brachionus plicatilis* fed with Pt and TISO culture with different formulations, produced a population density of IAPt4=ALGAL (227 rotifers. mL^{-1}), AHPt4 (324 rotifers. mL^{-1}), AEPA4 (350 rotifers. mL^{-1}), AEPA8 (565 rotifers. mL^{-1}) y AEPA16 (428 rotifers. mL^{-1}) ($p<0,05$) with Pt and rIATiso4=ALGAL (189 rotifers. mL^{-1}), rAHPTiso4 (326 rotifers. mL^{-1}), rADHA4 (236 rotifers. mL^{-1}), rADHA8 (338 rotifers. mL^{-1}) y rADHA16 (334 rotifers. mL^{-1}) ($p<0,05$) with TISO. Therefore the quality of

food via the mineral complexity of the formulations with which were cultured, was the swing that produced the aforementioned generation population, which showed the following production of eggs.mL⁻¹, **AHPpt4** (168 eggs.mL⁻¹), **AEPA4** (170 eggs.mL⁻¹), **AEPA8** (259 eggs.mL⁻¹) and **AEPA16** (219 eggs.mL⁻¹) with respect to control (**IAPt4=ALGAL**) with 124 eggs.mL⁻¹ ($p<0,05$) which corresponded to 0,73, 0,49, 0,46, 0,51 y 0,38 eggs.female⁻¹ respectively. While with TISO **rAHPTiso4** (115 eggs.mL⁻¹), **rADHA4** (76 eggs.mL⁻¹), **rADHA8** (102 eggs.mL⁻¹) and **rADHA16** (106 eggs.mL⁻¹) with respect at control (**rAIPT4=ALGAL**) with 11 eggs.mL⁻¹ ($p<0,05$), which indicated 0,42, 0,37, 0,39, 0,44 and 0,05 eggs.female⁻¹ comparatively. Our results revealed that different formulations of culture for the microalgae modified your nutritional quality, what led to modify the rate generational in *Brachionus plicatilis*, a very important biotechnological tool in the production of live food for the following aquatic trophic levels. Reason circadian rhythm 12L:12O to which were subjected to rotifer cultures, we observed a great uniformity of size, likewise a large number of females early in the cycle of light showed between 3 and 5 eggs. They originated the following values of population growth rate (r) for rotifers fed with PT and TISO enriched with different formulations, were **AHPpt4** (0,23 day⁻¹), **AEPA4** (0,24 day⁻¹), **AEPA8** (0,30 day⁻¹) and **AEPA16** (0,27 day⁻¹) showed better performance with respect to the media **IAPt4=ALGAL** with 0,19 day⁻¹ and **AHPTiso4** (0,24 day⁻¹), **ADHA4** (0,19 day⁻¹), **ADHA8** (0,24 day⁻¹) and **ADHA16** (0,24 day⁻¹) exhibited better performance with respect to the media **IATiso4=ALGAL** with 0,17 day⁻¹, respectively. As regards at the food conversion ratio (FCR $p<0,05$) and percentage of growth efficiency (%GE $p<0,05$) by the rotifer, was variable with Pt revealing values of **AHPpt4** (2,47-40,54%), **AEPA4** (2,35-42,53%), **AEPA8** (2,52-39,70%), **AEPA16** (2,10-47,57%) with respect at media **IAPt4=ALGAL** with 1,57-63,65%; values while **AHPTiso4** (2,59-38,55%), **ADHA4** (2,21-45,26%), **ADHA8** (2,37-42,24%), **ADHA16** (3,11-32,11%) with respect to the media **IATiso4=ALGAL** with 1,83-54,36% corresponded to TISO. In order of energy importance the content of protein in the rotifer (ng.rotifero⁻¹) was the major biochemical fuel, once fed with the microalgae cultured with different formulations, with values of 130,15ng.rotifer⁻¹ (**IAPt4=ALGAL**), 136,33 ng.rotifer⁻¹ (**AHPpt4**), 135,57 ng.rotifer⁻¹ (**AEPA4**), 160,07 ng.rotifer⁻¹ (**AEPA8**) and 190,42 ng.rotifer⁻¹ (**AEPA16**) ($p<0,05$) for Pt; while with TISO showed 127,07 ng.rotifer⁻¹ (**rIATiso4=ALGAL**), 134,04 ng.rotifer⁻¹ (**rAHPTiso4**), 142,59 ng.rotifer⁻¹ (**rADHA4**), 151,19 ng.rotifer⁻¹ (**rADHA8**) and 157,66 ng.rotifer⁻¹ (**rADHA16**) ($p<0,05$). The second fuel is accounted for lipid content showed for Pt 104,48 ng.rotifer⁻¹ (**IAPt4=ALGAL**), 130,01 ng.rotifer⁻¹ (**AHPpt4**), 127,95 ng.rotifer⁻¹ (**AEPA4**), 133,21 ng.rotifer⁻¹ (**AEPA8**) and 191,77 ng.rotifer⁻¹ (**AEPA16**); as regard to treatment with TISO, the analysis indicated values of 49,12 ng.rotifer⁻¹ (**rIATiso4=ALGAL**), 52,16 ng.rotifer⁻¹ (**rAHPTiso4**), 66,72 ng.rotifer⁻¹ (**rADHA4**), 72,50 ng.rotifer⁻¹ (**rADHA8**) and 70,27 ng.rotifer⁻¹ (**rADHA16**) ($p<0,05$). Carbohydrates in the rotifer revealed with Pt contents around at 57,31, 64,48, 59,78, 84,20 y 82,00 ng.rotifer⁻¹ presents in **IAPt4=ALGAL**, **AHPpt4**, **AEPA4**, **AEPA8** y **AEPA16** ($p<0,05$) comparatively. Also indicated treatments with TISO values of 28,73, 33,62, 50,61, 44,12 y 41,14 ng.rotifero⁻¹ presents in **rAITiso4=ALGAL**, **rAARTiso4**, **rADHA4**, **rADHA8** and **rADHA16** ($p<0,05$) comparatively. The biochemical composition produced an caloric value (CV) with Pt of 82,36x10⁷J.rotifer⁻¹ (**IAPt4=Algal**), 95,20x10⁷J.rotifer⁻¹ (**AHPpt4**), 93,41x10⁷J.rotifer⁻¹ (**AEPA4**), 105,48x10⁷J.rotifer⁻¹ (**AEPA8**), 135,65x10⁷J.rotifer⁻¹

(AEPA16) ($p < 0,05$), while with TISO $54,79 \times 10^7$ J.rotifer⁻¹ ($rIATiso4=ALGAL$), $58,50 \times 10^7$ J.rotifer⁻¹ ($rAHPTiso4$), $69,20 \times 10^7$ J.rotifer⁻¹ ($rADHA4$), $72,46 \times 10^7$ J.rotifer⁻¹ ($rADHA8$), $72,62 \times 10^7$ J.rotifer⁻¹ ($rADHA16$). *Brachionus plicatilis* in based at the various media with which their food was cultured revealed an dry weight of 299,01 ng.rotifer⁻¹ ($IAPt4=ALGAL$), 340,02 ng.rotifer⁻¹ ($AHPpt4$), 332,48 ng.rotifer⁻¹ ($AEPA4$), 390,58 ng.rotifer⁻¹ ($AEPA8$) and 482,34 ng.rotifer⁻¹ ($AEPA16$) ($p < 0,05$) with Pt; so that with TISO 211,37 ng.rotifer⁻¹ ($rIATiso4=ALGAL$), 227,05 ng.rotifer⁻¹ ($rAHPTiso4$), 269,38 ng.rotifer⁻¹ ($rADHA4$), 277,96 ng.rotifer⁻¹ ($rADHA8$) and 279,46 ng.rotifer⁻¹ ($rADHA16$) ($p < 0,05$). The dry weight of one rotifer is highly variable in the literature, is commonly found values between 300 and 600 ng, so it was evident that based on food quality via the mineral diversity tested in this study, is that exerted an effect on the variation of dry weight in the rotifer. The ash content for rotifer, varied with respect to the formulation with was the microalgae cultivated as food, so that with Pt showed the following values, where the control medium showed 7,47 ng.rotifer⁻¹ ($IAPt4=ALGAL$) while with the mediums $AHPpt4$, $AEPA4$, $AEPA8$ y $AEPA16$ revealed 9,20, 9,18, 13,10 y 18,15 ng.rotifer⁻¹ ($p < 0,05$) respectively; while with TISO the control medium showed 6,45 ng.rotifer⁻¹ ($rIATiso4=ALGAL$) with respect at the mediums $rAHPTiso4$, $rADHA4$, $rADHA8$ y $rADHA16$ that expressed 7,23, 9,46, 10,15 y 10,39 ng.rotifer⁻¹ ($p < 0,05$) respectively. The incorporation of Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{4+} , Se^{2-} , Fe^{3+} , S^{2-} , Zn^{2+} y Cu^{2+} for *Brachionus plicatilis* via *Phaeodactylum tricornutum* and *Isochrysis galbana* var. T-iso was very variable depending of culture medium, which indicates the existence of highly significant differences ($p = 0,001$) between conditions ($p < 0,05$). These differences were consistent with values reported for ash at all culture conditions, which were also evident in the behavior of dry weight and organic of rotifer via the food. An increase in the number of elements-ingredients for culture media, was reflected in the microalgae (Chapters 6 and 7) and therefore in the next trophic level (rotifer), thus causing a decrease in organic weight together variations in dry weight of rotifer. The content of fatty acids in *Brachionus plicatilis* showed the same trend that the microalgae Pt and TISO cultured with different formulations; where the FA principal of rotifer fed with Pt of 20:5(n-3) ($p < 0,05$) indicated 4,01% ($IAPt4=ALGAL$), 5,43% ($AHPpt4$), 4,90% ($AEPA4$), 7,69% ($AEPA8$) and 8,65% ($AEPA16$) of total your FA, while with TISO the 22:6(n-3) ($p < 0,05$) showed values of 4,19% ($rIATiso4=ALGAL$), 5,38% ($rAARTiso4$), 4,04% ($rADHA4$), 5,25% ($rADHA8$) and 4,42% ($rADHA16$) of total your FA. Based on the different formulations with which the microalgae cultivation as food is that was feasible to modify the proportion of FA ω -3: ω -6 in rotifers fed with Pt between 1,68:1 and 2,75:1% ($p < 0,05$) and 1,25:1 to 1,43:1% ($p < 0,05$) with TISO. Regarding to the ratio EPA:ARA (Pt) and DHA:ARA (TISO) in the rotifer we change those ratios with values of 11,46:1% ($rIAPt4=ALGAL$), 18,72:1% ($rAHPpt4$), 21,30:1% ($rAEPA4$), 21,97:1% ($rAEPA8$) and 32,04:1% ($rAEPA16$) ($p < 0,05$) with Pt, while with TISO 0,84:1% ($rIATiso4=ALGAL$), 1,37:1% ($rAHPTiso4$), 1,01:1% ($rADHA4$), 1,21:1% ($rADHA8$) and 1,35:1% ($rADHA16$) ($p < 0,05$) with TISO. About to the reason DHA:EPA in rotifers fed with TISO differences were highly significant ($p = 0,001$) between the experimental conditions ($p < 0,05$) with values of 7,17:1% ($rIATiso4=ALGAL$), 8,15:1% ($rAHPTiso4$), 10,01:1% ($rADHA4$), 9,72:1% ($rADHA8$) and 6,51:1% ($rADHA16$) ($p < 0,05$). As regards the rotifers fed with Pt the FA docosahexaenoic acid (DHA 22:6 n-3) was present in the range of 0,55 to

1,27% of total FA, the presence of such FA resulted from the desaturation and elongation of FA 22:5n-3 (docosapentaenoic) which showed a higher concentration respect at the of DHA in the range of 0,59 to 1,57%. In regard to the performance of different microalgae diets in *Artemia franciscana*; the survival of *Artemia*+Pt and *Artemia*+TISO to the T₁₀ and T₉ days of culture respectively, indicated values of 64% (*aIAPt4=ALGAL*), 80% (*aAHPpt4*), 85% (*aAEPA4*), 88% (*aAEPA8*) y 91% (*aAEPA16*) ($p<0,05$) with Pt. As with TISO 67% (*aIATiso4=ALGAL*), 82% (*aAHPTiso4*), 73% (*aADHA4*), 85% (*aADHA8*) and 84% (*aADHA16*) ($p<0,05$). Observed and high correlation $r^2=0,99$ and 0,71 when *Artemia* was fed with the conditions *aAEPA* y *aADHA* respectively, with different concentration of nutrients (4, 8, y 16mM). The total length (TL) achieved by adults of different treatments was 6,17mm⁻¹ (*aIAPt4=ALGAL*), 7,33mm⁻¹ (*aAHPpt4*), 8,70mm⁻¹ (*aAEPA4*), 9,53mm⁻¹ (*aAEPA8*) y 9,81mm⁻¹ (*aAEPA16*) ($p<0,05$) with Pt. While dimensions with TISO of 5,44mm⁻¹ (*aIATiso4=ALGAL*), 7,71mm⁻¹ (*aAHPTiso4*), 6,53mm⁻¹ (*aADHA4*), 8,64mm⁻¹ (*aADHA8*) and 8,67mm⁻¹ (*aADHA16*) ($p<0,05$); with positive correlation coefficients $r^2=0,92$ and 0,76 when were employed the conditions *aAEPA* y *aADHA* in concentration 4, 8 y 16mM. As these organism with Pt showed an feed conversion rate (FCR) and percentage of growth efficiency (%GE) of *aIAPt4=ALGAL*(2,14-46,68%), *aAHPpt4*(3,37-29,68%), *aAEPA4*(2,00-49,90%), *aAEPA8*(2,26-44,19%) and *aAEPA16*(3,94-25,39%) ($p<0,05$) and values of *aIATiso4=ALGAL*(2,17-46,15%), *aAHPTiso4*(2,59-38,53%), *aADHA4*(3,01-33,26%), *aADHA8*(2,88-34,74%) and *aADHA16*(3,28-30,48%) with TISO. The behavior of the above variables informed us how important is the complexity elemental in the quality of food via trophic chain and your nutritional performance on operational variables of culture. The quality of the microalgae due to the different culture media, showed different growth rates (GR) in *Artemia* so that with Pt were obtained 0,56 mm.día⁻¹(*aIAPt4=ALGAL*), 0,67 mm.day⁻¹ (*aAHPpt4*), 0,79 mm.day⁻¹ (*aAEPA4*), 0,87 mm.day⁻¹ (*aAEPA8*) and 0,89 mm.day⁻¹ (*aAEPA16*) ($p<0,05$) and values of 0,60 mm.day⁻¹(*aIATiso4=ALGAL*), 0,86 mm.day⁻¹ (*aAHPTiso4*), 0,72 mm.day⁻¹ (*aADHA4*), 0,96 mm.day⁻¹ (*aADHA8*), 0,96 mm.day⁻¹ (*aADHA16*) ($p<0,05$) with TISO. The dry weight gained by adults of *Artemia franciscana* based diets was highly variable obtained 172,98 µg.artemia⁻¹ (*aIAPt4=ALGAL*), 234,22 µg.artemia⁻¹ (*aAHPpt4*), 352,46 µg.artemia⁻¹ (*aAEPA4*), 334,78 µg.artemia⁻¹ (*aAEPA8*) y 231,38 µg.artemia⁻¹ (*aAEPA16*) ($p<0,05$) with Pt, while with TISO 161,49 µg.artemia⁻¹ (*aIATiso4=ALGAL*), 204,23 µg.artemia⁻¹ (*aAHPTiso4*), 178,20 µg.artemia⁻¹ (*aADHA4*), 205,69 µg.artemia⁻¹ (*aADHA8*) and 238,51 µg.artemia⁻¹ (*aADHA16*) ($p<0,05$). Results that indicating that the variability in the nutritional quality of the microalgae influence in the nutrition and growth of the organism; nutritional quality that in our study was to be modify via the mineral enrichment of the microalgae with different formulations of culture. The ash content for adult of *Artemia*+Pt (µg.artemia⁻¹) varied with respect to the type of diet with the following values 9,94 (*aIAPt4=ALGAL*), 13,67 (*aAHPpt4*), 19,95 (*aAEPA4*), 18,65 (*aAEPA8*) and 13,30 (*aAEPA16*) ($p<0,05$), while *Artemia*+TISO values of 8,99 (*aIATiso4=ALGAL*), 11,74 (*aAHPTiso4*), 10,12 (*aADHA4*), 11,48 (*aADHA8*) and 13,37 (*aADHA16*) ($p<0,05$). The incorporation of Mg²⁺, Ca²⁺, Si⁴⁺, Se²⁻, Fe³⁺, S²⁻, Zn²⁺ and Cu²⁺ by adult *Artemia franciscana* via *Phaeodactylum tricornutum* and *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivated with different formulation and concentration was highly variable which indicates the existence of highly

significant differences ($p=0,001$) between conditions ($p<0,05$). Such differences are consistent with the reported variability of ash in all microcrustaceans' culture conditions, which are also evident in the behaviour of the dry weight and organic of *Artemia* via the food. Reinfelder *et al.*, 1998, suggest that the bioaccumulation of an element based on simple conceptual models where the concentration of the element in the organism is controlled by the balance between consumption, elimination and growth phase, as occurs in bivalves, copepods, rotifers and *Artemia* (Wang and Fisher, 1998) and as a via of bioaccumulation the microalgae (Lee and Luoma, 1998). The total protein content in adults of *Artemia* fed with Pt showed $110,92\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*aIAPt4=ALGAL*), $123,13\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*aAHPpt4*), $240,12\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*aAEPA4*), $224,48\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*aAEPA8*) and $127,90\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*aAEPA16*) ($p<0,05$), values that were above those obtained with *Artemia*+TISO with $84,92\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*aIATiso4=ALGAL*), $104,95\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*aAHPTiso4*), $92,04\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*aADHA4*), $105,30\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*aADHA8*) and $134,05\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*aADHA16*) ($p<0,05$), however the microcrustaceans fed with the conditions *aADHA* with different concentration of nutrients (4, 8 y 16mM) indicated a $r^2=0,96$ with linear trend in the increase content of organism protein. While the total lipid content of *Artemia*+Pt showed $31,16\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*aIAPt4=ALGAL*), $66,40\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*aAHPpt4*), $60,31\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*aAEPA4*), $65,04\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*aAEPA8*) y $63,47\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*aAEPA16*) ($p<0,05$), while those obtained with *Artemia*+TISO showed $41,33\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*aIATiso4=ALGAL*), $52,39\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*aAHPTiso4*), $46,62\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*aADHA4*), $53,20\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*aADHA8*) and $59,37\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ (*aADHA16*) ($p<0,05$), where the condition *aADHA4*, 8 and 16 mM indicated a correlation coefficient of 0,99 with linear trend in the increase content of organism lipids. The carbohydrates content *Artemia*+Pt revealed values of 20,96, 31,02, 40,18, 26,61 and $26,71\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ ($p<0,05$) presents in *aIAPt4*, *aAHPpt4*, *aAEPA4*, *aAEPA8* and *aAEPA16* comparatively, while with *Artemia*+TISO values of 26,24, 35,13, 30,02, 35,71 and $31,72\mu\text{g}.\text{artemia}^{-1}$ ($p<0,05$) presents in *aIATiso4*, *aAHPTiso4*, *aADHA4*, *aADHA8* and *aADHA16* respectively. This proximal content produced a caloric value (CV) with *Artemia*+Pt of $4,25\times 10^{-6}\text{J}.\text{artemia}^{-1}$ (*aIAPt4=ALGAL*), $6,11\times 10^{-6}\text{J}.\text{artemia}^{-1}$ (*aAHPpt4*), $8,63\times 10^{-6}\text{J}.\text{artemia}^{-1}$ (*aAEPA4*), $8,41\times 10^{-6}\text{J}.\text{artemia}^{-1}$ (*aAEPA8*) and $6,03\times 10^{-6}\text{J}.\text{artemia}^{-1}$ (*aAEPA16*) ($p<0,05$), values that were higher than those obtained with *Artemia*+TISO with $4,12\times 10^{-6}\text{J}.\text{artemia}^{-1}$ (*aIATiso4=ALGAL*), $5,19\times 10^{-6}\text{J}.\text{artemia}^{-1}$ (*aAHPTiso4*), $4,56\times 10^{-6}\text{J}.\text{artemia}^{-1}$ (*aADHA4*), $5,24\times 10^{-6}\text{J}.\text{artemia}^{-1}$ (*aADHA8*) and $6,10\times 10^{-6}\text{J}.\text{artemia}^{-1}$ (*aADHA16*) ($p<0,05$). In relation to the content of fatty acids in *Artemia franciscana*, this was modulated by the quality of the microalgae enriched with different formulations of culture, where the principal FA in the adults of *Artemia*+Pt the 20:5 (n-3) ($p<0,05$) was found with following values 6,34% (*aIAPt4=ALGAL*), 6,54% (*aAHPpt4*), 8,49% (*aAEPA4*), 6,35% (*aAEPA8*) and 5,56% (*aAEPA16*) ($p<0,05$), while the *Artemia*+TISO the 22:6(n-3) ($p<0,05$) expressed the following values 0,48% (*aIATiso4=ALGAL*), 0,61% (*aAHPTiso4*), 0,63% (*aADHA4*), 0,54% (*aADHA8*) and 0,44% (*aADHA16*) ($p<0,05$). Indicate that the percentage content of DHA and EPA in the microalgae diet enriched with different culture media, in all cases was above percentage values found in *Artemia* once fed with these diets, this decrease is due to that this microcrustaceans has a marked propensity to retroconversion long chain fatty acids to short (Evjemo *et al.*, 1997, Navarro *et al.*, 1999) both in quantity and quality, depending on

the time of enrichment or food, which would indicate that the used in processes of growth and sexual maturation, which are indicative of the values described as FCR and %GE. This coincides with ARA values found in adults of *Artemia* which showed the following results 2,51% (*aIATiso4=ALGAL*), 2,69% (*aAHPTiso4*), 1,98% (*aADHA4*), 1,54% (*aADHA8*) and 2,72% (*aADHA16*) with respect a 1,62% (*IATiso4=ALGAL*), 0,95% (*AHPTiso4*), 0,29% (*ADHA4*), 0,40% (*ADHA8*) and 0,48% (*ADHA16*) founds in *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivated and enriched with different culture media. With such quality microalgae, is that was possible to modify the ratio of FA ω -3: ω -6 in *Artemia*+Pt between 3,24:1% to 5,36:1% ($p<0,05$), reason that with *Artemia*+TISO revealed to be almost three times lower in efficiency around a 1,23:1% to 1,59:1% ($p<0,05$). Regarding to the proportion EPA:ARA in *Artemia franciscana* given the quality microalgae due to enrichment with different formulations of culture is that we modify those ratios with values of 14,09:1% (*aIAPt4=ALGAL*), 19,23:1% (*aAHPpt4*), 18,02:1% (*aAEPA4*), 21,90:1% (*aAEPA8*) and 25,27:1% (*aAEPA16*) ($p<0,05$) with Pt. Concerning at the reason DHA:EPA in *Artemia* fed with TISO, highly significant differences were found ($p=0,001$) between the elementary experimental conditions ($p<0,05$) with values of 1,34:1% (*aIATiso4=ALGAL*), 1,56:1% (*aAHPTiso4*), 1,96:1% (*aADHA4*), 2,08:1% (*aADHA8*) and 0,88:1% (*aADHA16*).

Chapter 10 of this dissertation evaluated, there being no previous history, the Antioxidant Capacity (AA) and Total Polyphenol Content (TPC) of the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Isochrysis galbana* var. T-iso, which were manipulated biochemically with the culture media Algal High Performance (*AHPpt* and *AHPTISO*) and Algal Increased Concentration of EPA and DHA. The microalgae tested showed an very different antioxidant activity around 5,0 to 81,0% (Radical Inhibition DPPH mg.mL⁻¹) for varieties of *Phaeodactylum tricornutum* (*IAPt4=ALGAL*, *AHPpt4*, *AEPA4*, *AEPA8*, *AEPA16*) ($p<0,05$); while the varieties of *Isochrysis galbana* var. T-iso (*IATISO4=ALGAL*, *AHPTISO4*, *ADHA4*, *ADHA8*, *ADHA16*) existed between 21 and 59% (Radical Inhibition DPPH mg.mL⁻¹) ($p<0,05$). An increase in the AA with the conditions *AEPA* and *ADHA* revealed high levels of correlation r^2 of 0,76 and 0,94 respectively, with adjusted to a linear trend, when increasing the concentration of nutrients (4, 8 y 16mM). The TPC (mg EAG.g⁻¹ microalgae) of the methanol fraction for *Isochrysis galbana* var. T-iso, showed the following values 2,30 (*IATISO4=ALGAL*), 2,50 (*AHPTISO4*), 1,80 (*ADHA4*), 2,50 (*ADHA8*) and 2,50 (*ADHA16*) ($p<0,05$). As regards *Phaeodactylum tricornutum* was obtained 2,40 (*IAPt4=ALGAL*), 2,50 (*AHPpt4*), 2,60 (*ADHA4*), 3,10 (*ADHA8*) y 5,20 (*ADHA16*) ($p<0,05$). Demonstrated that culture conditions *ADHA* and *AEPA* with different concentration of nutrients (4, 8 y 16mM) adjusted their TPC to a positive linear trend with a 0,75 and 0,89 respectively. Based on previous results obtained a correlation (R^2) between the AA and the TPC of 0,40, 0,84, 0,75 and 0,96 (revealing a positive association $p<0,001$) for *Phaeodactylum tricornutum* and *Isochrysis galbana* var. T-iso cultivated and enriched with the formulations *IAPt4=ALGAL*, *AHPpt4*, *AITISO4=ALGAL* and *AARTISO4* respectively. While that with the culture condition *AEPA* with different concentrations of nutrients (4, 8 and 16mM) indicated R^2 of 0,96, 0,87, 0,92 ($p<0,001$), while that the condition *ADHA* expressed $R^2=0,95$, 0,82 and 0,98 ($p<0,001$).

Chapter 11 was studied the cell size (FS), Cellular Complexity or Granularity (SS) and Autofluorescence (Cla), by flow cytometry on the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Isochrysis galbana* var. T-iso, manipulated biochemically with the culture media Algal High Performance (AHPpt and AHPTISO) and Algal Increased Concentration EPA and DHA. The results of flow cytometry we showed the existence of highly significant differences ($p=0,001$) between culture conditions ($p<0,05$) in both microalgae. Also indicate that the conditions of culture AEPA and ADHA with different concentration of nutrients (4, 8 and 16mM), showed correlation coefficients of $R^2=0,75$ and 1,0 correspondingly with adjusted to a positive linear trend in the increase of cell size. Variations in the size given the complexity elemental of AHPpt4, AEPA4, 8 y 16 showed and oscillation of between 3,13 y 24,83% in cells of *Phaeodactylum tricornutum* with respect a cells of the condition IAPt4=ALGAL, while in cells of *Isochrysis galbana* var. T-iso with AHPTISO4, ADHA4, 8 y 16 increases of the size were found between 12,94 and 22,84%, compared with cells cultured with IATISO4=ALGAL. In regard at the cell complexity or granularity (SSC) due to the elemental composition in the formulations of culture with *Phaeodactylum tricornutum* (IAPt4=ALGAL, AHPpt4, AEPA4, 8 y 16) and *Isochrysis galbana* var. T-iso (IATISO4=ALGAL, AHPTISO4, ADHA4, 8 y 16); the flow cytometry indicated differences ($p<0,05$), but can not establish a specific cellular mechanism that are due. The values found for the content of chlorophyll a, we revealed the existence of differences between the different formulations of culture ($p<0,05$) in both microalgae. Also indicate that the conditions AEPA and ADHA cultured with different concentration of nutrients (4, 8 and 16mM), showed correlation coefficients of $R^2=0,98$ and 1,0, with adjusted to a positive linear trend in the content chlorophyll a. The results autofluorescence of chlorophyll a in the present study are at a maximum of 24 h, because the cultures were found in a semicontinuous with a daily renewal rate of 30%, resulting in increases of fluorescence given the complexity elemental with AHPpt4 and AEPA4, 8 and 16mM of between a 9,76 and 696,48% in cells of *Phaeodactylum tricornutum* with respect to the condition IAPt4=ALGAL, while in cells of *Isochrysis galbana* var. T-iso with AHPTISO4 and ADHA4, 8 and 16 was found fluorescence of between 4,94 and 69,11%, compared with cells cultured with IATISO4=ALGAL. Moreover, the program of analysis of data obtained by flow cytometry provides sufficient grounds to ensure that the values of autofluorescence of the chlorophyll a in the cells of *Phaeodactylum tricornutum* and *Isochrysis galbana* var. T-iso correspond with the cell size produced by different formulations of culture, with a correlation coefficient $R^2=0,75$ and 0,72 respectively, with adjusted in both microalgae to a positive linear trend.

Referencias

- √Abreu-Grobois, F.A., Briseño-Dueñas R., Herrera, M.A. & Malagon M. L. 1991. A model for growth of *Artemia franciscana* based of food ration-dependent gross growth efficiencies. **Hydrobiologia**, 212: 27-37.
- √Acien Fernández, F., Sánchez Pérez, J., Fernández Sevilla, J., García Camacho, F. & Molina Grima, E. 2000. Modelling of eicosapentaenoic acid (EPA) production from *Phaeodactylum tricornutum* cultures in tubular photobioreactors. Effects of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance. **Biotechnology and Bioengineering**, 68(2): 173-183.
- √Admiraal, W., Peletier, H., Lane, R.W.P.M. 1986. Nitrogen methabolism of marine planktonic diatoms, excretion, assimilation and cellular pools of free amino acids in seven species with different cell size. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 98: 241-263.
- √Ahmed, H., Schott, E. J., Gauthier, J. D. & Vasta, G. R. 2003. Superoxide dismutase from the oyster parasite *Perkinsus marinus*: purification, biochemical characterization, and development of a plate microassay for activity. **Analytical Biochemistry**, 318: 132-141.
- √Albentosa, M., Labarta, U., Pérez-Camacho, A. & Fernández-Reiriz, M. J. 1996. Fatty acid composition of *Ruditapes decussates* spat fed on different microalgae diets. **Comp. Biochem. Physiol.**, 113(2): 113-119.
- √Allan, J. D. 1976. Life history patterns in zooplankton. **Am. Nat.**, 110: 165-180.
- √Allen, E. J., and Nelson, E. W. 1910. On the artificial culture of marine plankton organism. **J. Mar. Biol. Assoc. UK**, 8: 421-474 pp.
- √Alva-Martínez, A. F., Fernández, R., Sarma, S.S.S. & Nandini, S. 2009. Effect of mixed toxic diets (*Microcystis* and *Chlorella*) on the rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus havanaensis* cultured alone and together. **Limnologica**, 39: 302-305.
- √Amarowicz, R., Naczki, M. & Shahidi, F. 2000. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of Canola hulls. **J. Agric. Food Chem.**, 48: 2755-2759.
- √Amenta, J. S. 1964. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography. **J Lipid Res.**, 5: 270-272.
- √Anagnostopoulou, M. A., Kefalas, P., Papageorgiou, V. P., Assimopoulou, A. N. & Bouskou, D. 2006. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chemistry**, 94: 19-25.
- √Andersen, R. A. 2005. Algal culturing techniques. *Phycological Society of America*. Elsevier Academic Press.
- √Andersen, S. & Ringvold, H. 2000. Seasonal differences in effect of broodstock diet on spawning success in the great scallop. **Aquaculture International**, 8: 259-265.
- √Anderson, M. A and Morel, F. M. 1982. The influence of aqueous iron chemistry on the uptake of iron by the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. **Limnol. Oceanograf.**, 27: 798-814 pp.
- √Anderson, T. & De Silva, S. 2003. Nutrition. In: Lucas, J. S., Southgate, P. C. (Eds), *Aquaculture: Farming Aquatic Plants and Animals*. Blackwell, Oxford, pp. 146-171.

- √Ando, Y., Samoto, H. & Murayama, Y. 2004. Positional distribution of DHA and EPA in triacyl-*sn*-glycerols (TAG) of *Artemia franciscana* nauplii enriched with fish oils ethyl esters and TAG. **Aquaculture.**, 233: 321-335.
- √Anh, N. T. N., Hoa, N. V., Van Stappen, G. & Sorgeloos, P. 2009. Effect of differential supplement feeds on proximate composition and *Artemia* biomass production in salt ponds. **Aquaculture.**, 286: 217-225.
- √Apines-Amar, M. J. S., Satoh, S., Caipang, C. M. A., Kiron, V., Watanabe, T. & Aoki, T. 2004. Amino acid-chelate: a better source of Zn, Mn, Cu for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture.**, 240: 345-358.
- √Apt, K. E. Kroth-Pancic, P. G. & Grossman, A. R. 1996. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Mol. Gen. Genet.**, 252: 572-579.
- √Arao, T., Kawaguchi, A. & Yamada, M. 1987. Positional distribution of fatty acids in lipids of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Phytochemistry.**, 26(9): 2573-2576.
- √Arias, D. G., Marquez, V. E., Beccaria, A. J., Guerrero, S. A. & Iglesias, A. A. 2009. Purification and Characterization of a Glutathione Reductase from *Phaeodactylum tricornutum*. **Protist** Article in Press.
- √Arnold, C. R. & Holt, G. J. 1991. Various Methods for the Culture of the Rotifer, *Brachionus plicatilis*, in Texas. In: Fulks W. & K. L. Main (Eds), Rotifer and Microalgae culture systems. Proceedings of a U. S.-Asia Workshop. The Oceanic Institute, Honolulu, HI: Argent Press. 119-124.
- √Atalah, E., Hernández Cruz, C. M., Izquierdo, M. S., Rosenlund, G., Caballero, M. J., Valencia, A. & Robaina, L. 2007. Two microalgae *Cryptocodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricornutum* as alternative source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (*Sparus aurata*). **Aquaculture.**, 270: 178-185.
- √Auffret, M. 2005. Bivalves as models for marine immunotoxicology. In: Tryphonas, H., Fournier, M., Blakley, B. R., Smits, J. E. G., Brousseau, P. (Eds.), Investigative Immunotoxicology. Models & Approaches in Immunotoxicology. CRC Press, pp. 29-48.
- √Axler, R. P., Gersberg, R. M. & Goldman, C. R. 1980. Stimulation of nitrate uptake and photosynthesis by molybdenum in Castle Lake, California. **Can. F. Fish. Aquat. Sci.**, 37: 707-12.
- √Baer, A., Langdon, C., Mills, S., Schulz, C. & Hamre, K. 2008. Particle size preference, gut filling and evacuation rates of the rotifer *Brachionus* "Cayman" using polystyrene latex beads. **Aquaculture.**, 282: 75-82.
- √Bajpai, P. & Bajpai, P. K. 1993. Eicosapentaenoic acid (EPA) production from microorganisms: a review. **J. Biotechnol.** 30 (2): 161-183.
- √Baker, E. P., Alves, D. & Bengtson, D. A. 1998. Effects of Rotifer and *Artemia* Fatty-Acid Enrichment on Survival, Growth and Pigmentation of Summer Flounder *Paralichthys dentatus* Larvae. **J. World Aquac. Soc.**, 29(4): 494-499.
- √Ballan-Dufrançais, C. 1991. Response of the phytoplanktonic alga *Tetraselmis suecica* to copper and silver exposure: vesicular metal bioaccumulation and lack of starch bodies. **Biol. Cel.**, vol. 72, no.1-2, 103-112 pp.

- √Ballantine, J. A., Lavis, A. & Morris, R. J. 1979. Sterols of the phytoplankton. Effects of illumination and growth stage. **Phytochemistry**, 18: 1459-1466.
- √Bandoniene, D. & Murkovic, M. 2002. On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 50: 2482-2487.
- √Barrows, F. T. & Hardy, R. W. 2001. *Nutrition and feeding*. In: Fish hatchery management. Second Edition, Wedemeyer, G. A., Bethesda, Maryland, American Fisheries Society. P. 483-558.
- √Barsanti, L & Gualtieri P. 2006. Algae: Anatomy, biochemistry, and biotechnology. CRC Press, Taylor and Francis Group. Boca Raton. 301 p.
- √Beck, J. L. & Turingan, R. 2007. The effects of zooplankton swimming behavior on prey-capture kinematics of red drum larvae *Sciaenops ocellatus*. **Mar. Biol.**, 151: 1463-1470.
- √Becker, E. W. & Venkatamaran, L. V. 1982. Biotechnology and exploitation of algae. The Indian Approach. **Deutsche Gesellschaft Fur Technische Zusammenarbeit GmbH, Exchborn.**, 216.
- √Becker, E. W. 1994. Chemical composition, Microalgae: Biotechnology and Microbiology, Cambridge University Press, New York, pp. 177-195.
- √Bell, J. G., Cowey, C. B., Adron, J. W. and Pirie, B. J. S. 1987. Some effects of selenium deficiency on enzyme activities and indices of tissue peroxidation in Atlantic salmon parr (*Salmo salar*). *Aquaculture* 65 (1), 43-54.
- √Bell, J. G., McEvoy, L. A., Esteves, A., Shields, R. J. & Sargent, J. R. 2003. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. **Aquaculture**, 227: 211-220.
- √Ben-Amotz, A., Tornabene, T. G. & Thomas, W. H. 1985. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. **J. Phycol.**, 21: 72-81.
- √Benedetti, S., Benvenuti, F., Pagliarani, S., Francogli, S., Scoglio, S. & Canestrari, F. 2004. Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. **Life Sci.**, 75: 2353-2362.
- √Bengtson, D. A. 2003. Status of marine aquaculture in relation to live prey: past, present and future. En: Live feeds in marine aquaculture. Støttrup, J. G. and McEvoy, L. A. (Eds.). Blackwell Publishing, Oxford, 1-16.
- √Benítez-Santana, T., Masuda, R., Juárez Carillo, E., Ganuza, E., Valencia, A., Hernández-Cruz, C. M. & Izquierdo, M. S. 2007. Dietary $n - 3$ HUFA deficiency induces a reduced visual response in gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. **Aquaculture**, 264: 408-417.
- √Berges, J. A; Franklin, D. J, and Harrison, P. J. 2001. Evolution of an artificial seawater medium: Improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades. **J. Phycol.**, vol. 37 (6): 1138-1145 pp.
- √Berland, B. R; Bonin, D. J; Guerin-Ansey, O, J; Kaprov, V. I, and Arhlac, D. P. 1977. Action des métaux lourds sur les caractéristiques de la croissance chez la distomeé *Skeletonema costatum*. **Mar. Biol.**, 42:17-30 pp.

- √Bessonart, M., Izquierdo, M. S., Salhi, M., Hernández-Cruz, C. M., González, M. M. & Fernández-Palacios, H. 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. **Aquaculture**, 179: 265-275.
- √Bhat, B. V. 1992. Potentials and prospects for an *Artemia* aquabusiness in India. **Seafood Export. J.**, 24: 27-31.
- √Bhatnagar, M; Bhatnagar, A, and Jha, S. 2002. Interactive biosorption by microalgal biomass as a tool for fluoride removal. **Biotechnol. Lett.**, vol. 24 (13): 1079-1081 pp.
- √Bitaubé Pérez, E., Caro Pina, I. & Pérez Rodríguez, L. 2008. Kinetic model for growth of *Phaeodactylum tricornutum* in intensive culture photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, 40: 520-525.
- √Bligh, E. G. and Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem. Physiol.**, 37: 911-917.
- √Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H. G., Northcote, P. T. & Prinsep, M. R. 2005. Marine natural products. **Natural Product Reports**, 22(1): 15-61.
- √Bold, H. C. and Wynne, M. J. 1985. Introduction to the algae. **Prentice Hall, Englewood, Cliffs**.
- √Bolaños, L., García-González, M., Mateo, P. & Bonilla, I. 1992. Differential toxicological response to cadmium in *Anabaena* strain PCC7119 grown with NO_3^- and NH_4 as nitrogen source. **J. Plant. Physiol.**, 140: 345-349.
- √Bontje, D., Kooi, B. W., Liebig, M. & Kooijman, S. A. L. M. 2009. Modelling long-term ecotoxicological effects on an algal population under dynamic nutrient stress. **Water Research**, 43: 3292-3300.
- √Borowitzka, M. A. & Volcani, B. E. 1978. The Polymorphic Diatom *Phaeodactylum tricornutum*: Ultrastructure of its Morphotypes. **J. Phycol.**, 14: 10-21.
- √Borowitzka, M. A. (1988). Fats oils and hydrocarbons. En: "Microalgal Biotechnology". Borowitzka, M. A. & Borowitzka, L. J. (Eds.). **Cambridge University Press**. Cambridge: 257-287.
- √Borowitzka, M. A. 1997. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. **J. Appl. Phycol.**, 9: 393-401.
- √Boss, B. C. & Fredeen, K. J. 1997. Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. Second Edition. Perkin Elmer Corporation.
- √Bouman, H. A., Ulloa, O., Scanlan, D. J., Zwirgmaier, K., Li, W. K., Platt, T., Stuart, V., Barlow, R., Leth, O., Clementson, L., Lutz, V., Fukasawa, M., Watanabe, S. & Sathyendranath, S. 2006. Oceanographic basis of the the global surface distribution of *Prochlorococcus* ecotypes. **Science**, 312: 918-921.
- √Boussiba, S. and Vonshak, A. 1991." Astaxanthin accumulation in the green algae *Haematococcus pluvialis*." **Plant Cell Physiol.**, 32: 1077-1082.
- √Braek, G. S., Malnes, D. and Jenesen, A. 1980. Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. Combined effect of zinc and cadmium on growth and uptake in some marine diatoms. **J. Exp. Mar. Biol.Ecol.**, 42: 39-54 pp.

- √Brand-Williams, W; Cuvelier, M. E, & Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**. 28 (1): 25-30.
- √Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary source, metabolism, and nutritional significance. **Nutr. Rev.**, 56: 317-333.
- √Brown, M. 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 145: 79-99.
- √Brown, M. R. & Miller, K. A. 1992. The ascorbic acid content of eleven species of microalgae used in mariculture. **J. Appl. Phycol.**, 4: 205-215.
- √Brown, M.R., Dunstan , G. A., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., Barret, S. M. & Le Roi, J. M. 1993. The influence of irradiance on the biochemical composition of the prymnesiophyte *Isochrysis sp* (clone T-iso). **J. Phycol.**, 29: 601-612.
- √Brown, M. R., Garland, C. D., Jeffrey, S. W., Jameson, I. D. & Leroy, J. M. 1993a. The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous culture of *Isochrysis sp*. (clone T-iso), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. **J. Appl. Phycol.**, 5: 285-296.
- √Brown, M. R. & Farmer, C. L. 1994. Riboflavin content of six species of microalgae used in mariculture. **J. Appl. Phycol.**, 6: 61-65.
- √Brown, M. R., Dunstan, G. A., Norwood, S. J. and Miller, K. A. 1996. Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. **Journal of Phycology** 32, 64-73.
- √Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K. & Dunstan, C. A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, 151:315-331.
- √Brown, M. R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C. & Trenerry, C. 1999. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. **J. Appl. Phycol.**, 11:247-255.
- √Bullock, G. R. & Petrusz, P. 1984. Techniques in immunocyto-chemistry. Vol. 4. Academic Press, San Diego.
- √Burguess, J. G., Iwamoto, K., Miura, Y., Takano, H. & Matsunaga, T. 1993. An optical fibre photobioreactor for enhanced production of the marine unicellular alga ***Isochrysis aff. galbana T-iso*** (UTEX LB 2307) rich in docosahexaenoic acid. **J. Appl. Microbiol. Biotech.**, 39: 456-459.
- √Burkill, P. H. & Mantoura, R. F. C. 1990. The rapid analysis of single marine cells by flow cytometry. **Physical Sciences and Engineering**, Vol. 333, No. 1628, Trace Analysis, pp. 99-112.
- √Cabezas del Toro, B. 1991. Utilización de microalgas marinas como complemento de dietas inertes para el cultivo de *Artemia sp*. Tesis Doctoral, Universidade de Santiago de Compostela. 242.
- √Cai, Y. Z., Luo, Q., Sun, M. & Corke, H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, 74: 2157-2184.
- √Cakir, A., Mavi, A., Yıldým, A., Duru, M. E., Harmandar, M. & Kazas, C. 2003. Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fraction. **J. Ethnopharmacol.**, 87: 73-83.

- √Camus, T. & Zeng, C. 2008. Effects of the photoperiod on egg production and hatching success, naupliar and copepodite development, adult sex ratio and life expectancy of the tropical calanoid *Acartia sinjiensis*. **Aquaculture.**, 280: 220-226.
- √Camus, T., Zeng, C. & McKinnon, A. D. 2009. Egg production, egg hatching success and population increase of the tropical paracalanid copepod, *Bestiolina similis* (Calanoida: Paracalanidae) fed different microalgal diets. **Aquaculture.**, 297: 169-175.
- √Carić, M., Sanko-Njire, J. and Skaramuca, B. 1993. Dietary effects of different feeds on the biochemical composition of the rotifer (*Brachionus plicatilis* Müller). *Aquaculture* 110, 141-150.
- √Carvalho, A. P., Pontes, I., Gaspar, H. & Malcata, F. X. 2006. Metabolic relationships between macro- and micronutrients, and the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid contents of *Pavlova lutheri*. **Enzyme and Microbial Technology.**, 38: 358-366.
- √Castro-Longoria, E. 2003. Egg production and hatching success of four *Acartia* species under different temperature and salinity regimes. **J. Crustac. Biol.**, 23: 289-299.
- √Cavalin, F. G. & Weirich, C. R. 2009. Larval performance of aquacultured Florida pompano (*Trachinotus carolinus*) fed rotifers (*Brachionus plicatilis*) enriched with select commercial diets. **Aquaculture.**, 292: 67-73.
- √Cellamare, M., Rolland, A. & Jacquet, S. 2010. Flow cytometry sorting of freshwater phytoplankton. **J. Appl. Phycol.**, 22: 87-100.
- √Ceron García, M., Sánchez Miron, A., Fernández Sevilla, J., Molina Grima, E. & García Camacho, F. 2005. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. **Biochemistry Process.**, 40(1): 297-305.
- √Chalup, M. S. & Laws, E. A. 1990. A test of the assumptions and predictions of recent microalgal growth models with the marine Phytoplankter *Pavlova lutheri*. **Limnol., Oceanogr.**, 35(3): 583-596.
- √Chen, F. 1996. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. **Trends in Biotechnology.**, 14: 421-426.
- √Chen, F., Li. H. B., Wong, R. N. S., Ji, G. & Jiang, Y. 2005. Isolation and purification of the bioactive carotenoid zeaxanthin from the microalga *Macrocystis aeruginosa* by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A.**, 1064: 183-186.
- √Cheung, M. & Wang, W. X. 2005. Influence of subcellular metal compartmentalization in different prey on the transfer of metals to a predatory gastropod. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** Vol. 286: 155-166.
- √Chiapelli, F; Vasil, A, and Hagerty, D. F. 1979. The protein concentration of crude cell and tissue extracts as estimated by the method of the dye-binding: comparison with the Lowry method. **Anal. Biochem.**, 94: 160-165 pp.
- √Chih, H. H. & Wen, T. W. 2009. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. **Bioresource Technology.**, 100: 3921-3926.

- √Chong, K. & Wang, W. X. 2000. Assimilation of Cd, Cr, and Zn by the green mussel *Perna viridis* and the clam *Ruditapes philippinarum*. **Environ. Toxicol. Chem.**, 19: 1660-1667.
- √Chontiyaputta, C. & Hirayama, K. 1978. Food selectivity of the rotifer *Brachionus plicatilis* feeding on phytoplankton. **Marine Biology.**, 45: 105-111.
- √Cid, B. A. 1993. Toxicidad del cobre sobre la diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum*. Bohlin. Tesis Doctoral. Universidade Da Coruña. 201 pp
- √Cohen, Z., Norman, H. A. & Heimer, Y. M. 1995. Microalgae as a source of omega 3 fatty acids. In: Simopoulos, A. P. (Ed.), *Plants in Human Nutrition, World Rev. Nutr, Diet*, Vol. 77, pp. 1-31, Basel: Karger.
- √Collos, Y., Mornet, F., Sciandra, A., Waser, N., Larson, A, and Harrison, P. J. 1999. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentration of nitrate in marine phytoplankton cultures. **J. Appl. Phycol.** 11: 179-184 pp.
- √Colombo, M. L., Risé, P., Giavarini, F., Angelis, L., DE Galli, C. & Bolis, C. L. 2006. Marine macroalgae as sources of polyunsaturated fatty acids. **Plant. Foods Hum. Nutr.**, 61: 67-72.
- √Conceição, L. E. C. 1997. Growth in early life stages of fishes: an explanatory model. PhD Thesis, pp. 1-209. Wageningen University, Wageningen.
- √Conceição, L. E. C., van der Meeren, T., Verreth, J. A. J., Evjen, M. S., Houlihan, D. F. & Fyhn, H. J. 1997. Aminoacid metabolism and protein turnover in larval turbot (*Scophthalmus maximus*) fed natural zooplankton or *Artemia*. **Mar. Biol.**, 129: 255-265.
- √Copeman, L. A., Parrish, C. C., Brown, J. A. & Harel, M. 1999. Effect of dietary ratios ofr DHA, EPA and ARA on early growth, survival and pigmentation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*). **Bull. Aquacult. Assoc. Can.**, 99: 19-21.
- √Cordero, B., Otero, A., Patiño, M., Arredondo B.O., and Fábregas, J. 1996." Astaxanthin production from the green algae *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions".
- √Coupland, K., Coupland, D. & Packer, C. 1996. New sources of stearidonic acid and the moderation of inflammation by plant oils containing stearidonate. **ISSFAL**.
- √Coutinho, P. 2008. La microalga marina *Rhodomonas lens*: optimización de las condiciones de cultivo y potencial biotecnológico. Ph D. University of Santiago de Compostela, Spain. Pp. 261.
- √Currie, R. S., Muir, D. C. G., Fairchild, W. L., Holoka, M. & Hecky, R. E. 1998. Influence of nutrient additions on cadmium bioaccumulation by aquatic invertebrates in littoral enclosures. **Environmental Toxicology and Chemistry.**, 17: 2435-2443.
- √D'Agostino, A. 1980. The vital requirements of *Artemia*: physiology and nutrition. In: The brine shrimp *Artemia*. Vol 2. Physiology, Biochemistry, Molecular Biology. G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels, and E. Jaspers (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium. 636 pp.

- √Dabrowski, K. 1983. Comparative aspects of protein digestion and amino acid absorption in fish and other animals. **Comp. Biochem. Physiol.**, A74: 417-425.
- √Dabrowski, K. 1986. Ontogenetical aspects of nutritional requirements in fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, A85: 639-655.
- √Dalsgaard, J., St. John, M., Kattne, G., Müller-Navarra, D. & Hagen, W. 2003. Fatty acid trophic marker in the pelagic marine environment. **Adv. Mar. Biol.**, 46: 227-247.
- √Daniel, G. F. & Chamberlain, A. H. 1981. Copper immobilization in feeding diatoms. **Bot. Mar.**, 24: 229-243.
- √Darley, M. W. 1987. Biología de las Algas: Enfoque Fisiológico. Ed. Limusa. 236 p.
- √Davidson, K., Flynn, K. J. & Cunningham, A. 1992. Non steady state ammonium-limited growth of the marine phytoflagellate, *Isochrysis galbana* Parke. **New Phytol.**, 122: 433-438.
- √Davies, A. G. 1976. The growth kinetics of *Isochrysis galbana* in cultures containing sub lethal concentrations of mercuric chloride. **J. Mar. Biol. Ass. UK**; 54: 157-169 pp.
- √de la Jara, A., Mendoza, H., Martel, A., Molina, Nordsström, de la Rosa, V. & Díaz, R. 2003. Flow cytometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate, *Cryptocodinium cohnii*. **Journal of Applied Phycology**, 15: 433-438.
- √De Roeck-Holtzhauer, T., Quere, I. & Calire, C. 1991. Vitamin analysis of Five planktonic microalgae and one macroalga. **J. Appl. Phycol.**, 3: 259-264.
- √Debelius, B., Forja, J. M., DelValls, A. & Lubián, L. M. 2009. Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 72: 1503-1513.
- √Delaporte, M., Chu, F. L., Langdon C., Moal, J., Lambert, C., Samain, J. F. & Soudant, P. 2007. Changes in biochemical and hematocyte parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* fed T-Iso supplemented with lipid emulsions rich in eicosapentaenoic acid. **J. Exp. Mar. Biol. and Ecol.**, 343: 261-275.
- √Dempster, T. A. and Sommerfeld, M. R. 1995. Growth and Lipid storage in the diatom *Nitzschia communis*. **Proceedings, Meeting of the Phycological Society of America**. Vol. 31.
- √Devos, M., Poisson, L., Ergon, F. & Pencreach, G. 2006. Enzymatic hydrolysis of phospholipids from *Isochrysis galbana* for docosahexaenoic acid enrichment. **Enzyme and Microbial Technology**, 39: 548-554.
- √Devresse, B.; Leger, P.; Sorgeloos, P.; Murata, O.; Nasu, T.; Ikeda, S.; Rainuzzo, J.R.; Reitan, K. I.; Kjorsvik, E.; Olsen, Y. 1994. "Improvement of flat fish pigmentation through the use DHA-enriched rotifers and artemia". **Aquaculture**. Vol. 124, no. 1-4, 287-288 pp.
- √Dhont, J. & Van Stappen, G. 2003. Biology, Tank Production and Nutritional Value of *Artemia*. In: Støttrup, J. G., McEvoy, L. A. (Eds.), *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Blackwell Science Ltd, pp. 65-112.
- √Dittmer, J. C. & Wells, M. A. 1969. Quantitative and qualitative analysis of lipids and lipid components. **Methods of Enzymology** 14: 482-530.

- √Domergue, F., Lerchl, J., Zahringer, U. & Heinz E. 2002. Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricornutum* front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis. **Eur. J. Biochem.**, 269: 4105-4113.
- √Domergue, F., Spiekermann, P., Lerchl, J., Beckman, C., Kilian, O., Kroth, P.G., Boland, W., Zahringer, U. & Heinz, E. 2003. New insight into *Phaeodactylum tricornutum* fatty acid metabolism. Cloning and functional characterization of plastidial and microsomal delta12-fatty acid desaturases. **Plant. Physiol.**, 131: 1648-1660.
- √Domínguez, A. R. 1999. Obtención de pigmentos a partir de microalgas. Tesis doctoral. **Universidad de Santiago de Compostela**: 99-135.
- √Dortch, Q. 1982. Effect of growth conditions on accumulation of internal nitrate, ammonium, aminoacids and protein in three marine diatoms. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 61(3): 243-264.
- √Dortch, Q., Clayton, J. R. Jr., Thoresen, S. S. & Ahmed, S. I. 1984. Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. **Marine Biology.**, 81: 237-250.
- √Dropp, M. R. 1961. Some chemical considerations in the design of synthetic culture media for marine algae. **Botanica. Mar.**, 2: 231-46.
- √Duan, X. J; Zhang, W. W; Li, X. M. & Wang, B. G. 2006. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. **Food Chemistry** 95: 37-43.
- √Dubelaar, G. B. J., Casotti, R., Tarran, G. A. & Biegala, I. C. 2007. Phytoplankton and their Analysis by Flow Cytometry. In: Flow Cytometry with Plant Cells. Jaroslav Doležal, Johann Greilhuber and Jan Suda (Eds). Wiley-VCH, pp. 287-320.
- √Dubelaar, G. B. J. & Jonker, R. R. 2000. Flow-cytometry as a tool for the study of phytoplankton. **Sci. Mar.**, 64: 135-156.
- √Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** 28: 350-356.
- √Duchemin, M. B., Wessel, N., Fournier, M. & Auffret, M. 2008. Flow-cytometric measurement of the clearance rate in the blue mussel *Mytilus edulis* and the development of a new individual exposure system for aquatic immunotoxicological studies. **Environmental Pollution.**, 153: 492-496.
- √Duerr, E. O., Molnar, A. & Sato. V. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. **J. Mar. Biotechnol.**, 7: 65-70.
- √Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Barrett, S. M. and Garland, C. D. 1993. Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. **J. Appl. Phycol.** 5 (1): 71-83.
- √Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Barrett, S. M., Leroi, J. M. & Jeffrey, S. W. 1994. Essential polyunsaturated fatty-acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). **Phytochemistry.**, 35: 155-161.
- √Durmaz, Y., Monteiro, M., Bandarra, N., Gökpınar, Ş. & Işık, O. 2007. The effect of low temperature on fatty acid composition and tocopherols of the red microalga *Porphyridium cruentum*. **J. Appl. Phycol.**, 19: 223-227.

- √Dyeberg, J. 1986. Linoleate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. **Nutrition Reviews.**, 44: 125-134.
- √Edvarsen, B., Eikrem, W., Green, J. C., Andersen, R. A., Moon-van der Staay, S. Y. & Medlin, L. K. 2000. Phylogenetic reconstructions of the Haptophyta inferred from 18S ribosomal DNA sequences and available morphological data. **Phycologia.**, 391: 19-35.
- √Eltgoth, M. L., Watwood, R. L. & Wolfe, G. V. 2005. Production and cellular localization of neutral long-chain lipids in the haptophyte algae *Isochrysis galbana* and *Emiliana huxleyi*. **J. Phycol.**, 41: 1000-1009.
- √Enright, C. T., Newkirk, J. F., Craigie, J. S. & Castell, J. D. 1986. Evaluation of phytoplankton as diet of juvenile *Ostrea edulis* L. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 96: 1-13.
- √Eppley, R. W. & Renger, E. H. 1974. Nitrogen assimilation of an oceanic diatom in nitrogen-limited continuous culture. **J. Phycol.**, 10: 15-23.
- √Estevez, A. & Kanazawa, A. 1995. "Effect of (n-3) PUFA and vitamin A Artemia enrichment on pigmentation success of turbot, *Scophthalmus maximus*". **Aquacult.Nutr.** Vol.1, no. 3, 159-168 pp.
- √Estevez, A., Ishikawa, M. & Kanazawa, A. 1997. Effects of arachidonic acid on pigmentation and fatty acid composition of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceous* (Temminck and Schelegel)). **Aquacult. Res.**, 28: 279-289.
- √Estevez, A.; Mcvay, L. A.; Bell, J. G.; Sargent, J. R. 1999. "Growth, survival. Lipid composition and pigmentation of turbot (*Acophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in Arachidonic and Eicosapentaenoic acids". **Aquaculture.** Vol. 180, no. 3-4, 321-343 pp.
- √Estevez, A., Kaneko, T., Seikai, T., Tagawa, M. & Tanaka, M. 2001. ACTH and MSH production in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae fed arachidonic acid enriched live prey. **Aquaculture.**, 192: 309-319.
- √Estudillo-del Castillo, C., Gasapin, R. S. & Leaño, E. M. 2009. Enrichment potencial of HUFA-rich thraustochytrid *Schizochytrium mangrovei* for the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Aquaculture.**, 293: 57-61.
- √Evjemo, J. O., Vadstein, O. & Olsen, Y. 2000. Feeding and assimilation kinetics of *Artemia franciscana* fed *Isochrysis galbana* (clone T.iso). **Marine Biology.**, 136: 1099-1109.
- √Evjemo, J. O. & Olsen, Y. 1999. Effect of food concentration on the growth and production rate of *Artemia franciscana* feeding on alga (T.iso). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 242: 273-296.
- √Evjemo, J. O., Coutteau, P., Olsen, Y. & Sorgeloos, P. 1997. The stability of docosahexaenoic acid in two *Artemia* species following enrichment and subsequent starvation. **Aquaculture.**, 155: 135-148.

- √F.A.O. 2007. " The state Aquaculture 2006. Ed. **FAO**, Rome, Italy. 129 pp + anexos.
- √F.A.O. 2009. " The state of world fisheries and Aquaculture 2008. Ed. **FAO**, Rome, Italy. 176 pp + anexos.
- √Fábregas, J. & Herrero, C., Cabezas, B. & Abalde, J. 1985a. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) buth with high nutrient concentrations. **Aquaculture**, 49: 231-244.
- √Fábregas, J. & Herrero, C. 1985. Marine microalgae as a potential source of single cell protein (SCP). **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 23: 110-113.
- √Fábregas, J. & Herrero, C. 1990. Vitamin content of four marine microalgae. Potential use as source of vitamins in nutrition. **Journal of Industrial Microbiology** 5: 259-264.
- √Fábregas, J. Herrero, C., Abalde, J., Liaño, R. & Cabezas, B. 1986a. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with high nutrient concentrations. **Aquaculture**, 53: 187-199.
- √Fábregas, J, Herrero, C., Cabezas, B. & Abalde, J. 1986b. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* (Parke) at varying nutrient concentration. **Aquaculture**, 50: 101-113.
- √Fábregas, J. 1982. Las microlagas marinas como eslabón de infraestructura en la microbiología marina: aislamiento, caracterización, ciclo celular, interacciones, y aprovechamiento tecnológico. Tesis Doctoral. **Universidad de Santiago** 467 pp.
- √Fábregas, J. and Herrero, C. 1986. Marine microalgae as a potential source of minerals in fish diets. **Aquaculture** 51: 237-243.
- √Fábregas, J., Abalde, J. and Herrero, C. 1989b . "Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate", **Aquaculture**. 83: 289-304.
- √Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B. and Veiga, M. 1984. "Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities.", **Aquaculture**. 42: 207-215.
- √Fábregas, J., García, D., Morales, E. D., Domínguez, A. and Otero, A. 1998a. Renewal rate of semicontinuous cultures of the microalga *Porphyridium cruentum* modifies phycoerythrin, exopolysaccharide and fatty acid production. **J. Ferm. Bioeng.** 86: 477-481.
- √Fábregas, J., Herrero, C., Abalde, J., Liaño, R. and Cabezas, B. 1986a. "Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with high nutrient concentrations", **Aquaculture** . 53: 187-199.
- √Fábregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. and Abalde, J. 1987. "Growth and biochemical variability of the marine microalga *Chlorella stigmatophora* in batch cultures with different salinities and nutrient gradient concentration.", **Br. phycol. J.** 22: 269-276.
- √Fábregas, J., Patiño, M., Arredondo-Vega, B. O., Morales, E, and Otero A. 1994. Light-nutrient interactions in synchronized cultures of microalgae: effect of dilution time in semi-continuous cultures. **Appl. Environ. Microbiol.**

- √Fábregas, J., Patiño, M., Arredondo-Vega, B.O., Tobar, J.L. and Otero, A. 1995. "Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*", **Appl Microbiol Biotechnol.** 44: 287-292.
- √Fábregas, J., Vázquez, V., Cabezas, B, and Otero, A. 1993. Tris not only controls the pH in microalgal cultures, but also feeds bacteria. **J. Appl. Phycol.**,5: 543-545 pp.
- √Fábregas, J; Dominguez, A; Lamela, T, and Otero A. 1998a. " Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis* ". **Biotechnology Letters**, 20 (6): 623-626 pp.
- √Fábregas, J; Herrero, C; Abalde, J; Cabezas, B, 1985a. Growth chlorophyll *a* and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch culture with different salinities and high nutrient concentrations. **Aquaculture** 50: 1-11 pp
- √Fábregas, J; Herrero, C; Cabezas, B, Abalde, J 1986b. "Biomass production and biochemical composition in mass cultures of the marine microalga *Isochrysis galbana* Parke at varying nutrient concentration. **Aquaculture.**,53: 101-113.
- √Fábregas, J., Cid, Á., Morales, E., Cordero, B. And Otero, A. 1996a. Discrepancies between cell volume and organic content in semi-continuous cultures of a marine microalga. **Letters in Applied Microbiology** 22, 206-208.
- √Fábregas, J., Patiño, M., Morales, E. D.; Cordero, B. And Otero, A. 1996b. Optimal renewal rate and nutrient concentration for the production of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in semicontinuous cultures. **Applied and Environmental Microbiology** 62 (1), 266-268.
- √Fábregas, J., Otero, A., Morales, E. D., Arredondo-Vega, B. O. and Patiño, M. 1998b. Modification of the nutritive value of *Phaeodactylum tricornutum* for *Artemia* sp. in semicontinuous cultures. **Aquaculture** 169, 167-176.
- √Fábregas, J., Otero, A., Morales, E., Cordero, B., Patiño, M. 1996. *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to *Artemia*. **Aquaculture.**,143: 197-204.
- √Fábregas, J., Otero, A., Morales, E. D., Arredondo-Vega, B. O. & Patiño, M. 1998. Modification of the nutritive value of *Phaeodactylum tricornutum* for *Artemia* sp. In semicontinuous cultures. **Aquaculture.**,169: 167-176.
- √Fábregas, J., Domínguez, A., Regueiro, M., Maseda, A. & Otero, A. 2000. Optimization of cultura medium for the continuos culture of the microalga *Haematococcus pluvialis*. **Applied Microbiology and Biotechnology.**, 53: 530-535.
- √Falkowski, P. G., Dubinsky, Z. & Wyman, K. 1985. Growth-irradiance relationships in phytoplankton. **Limnol. Oceanogr.**, 30(2): 311-321.
- √Fan, L., Vonshak, A. and Boussiba, S. 1994." Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis*". **J. Phycol.**, 30: 829-833.
- √Farías, A., Bell, J. G., Uriarte, I. & Sargent, J. R. 2003. Polyunsaturated fatty acids in total lipid and phospholipids of chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L.) larvae: effects of diet and temperature. **Aquaculture.**, 228: 289-305.

- √Feng, F. Y., Yang, W., Jiang, G. Z., Xu, Y. N. & Kuang, T. Y. 2005. Enhancement of fatty acid production of *Chlorella* sp. (Chlorophyceae) by addition of glucose and sodium thiosulphate to culture medium. **Process Biochemistry.**, 40: 1315-1318.
- √Fernández Reiríz, M. J., Pérez-Camacho, A., Ferreiro, M. J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M. J. & Labarta, U. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (Total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. **Aquaculture.**, 83: 17-37.
- √Fernández Sevilla, J. M. 1995. *Estudio del crecimiento simultáneo fotolimitado y fotoinhibido de la microalga marina Isochrysis galbana. Productividad en ácidos grasos poliinsaturados n-3*. PhD thesis. Universidad de Almería.
- √Fernández Sevilla, J., Ceron García, M., Sánchez Miron, A., El Hassan, B., García Camacho, F. & Molina Grima, E. 2004. Pilot-plant-scale outdoor mixotrophic cultures of *Phaeodactylum tricornutum* using glycerol in vertical Hubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch mode. **Biotechnology Progress.**, 20(3): 728-736.
- √Fernández, I., Hontoria, F., Ortiz-Delgado, J. B., Kotzamanis, Y., Estevez, A., Zombonino-Infante, J. L. & Gisbert, E. 2008. Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of Vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). **Aquaculture.**, 283: 102-115.
- √Fernández-Reiriz, M. J., Pérez-Camacho, S. A., Ferreiro, M. J., Planas, M., Campos, M. J. & Labarta, U. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. **Aquaculture.**, 83: 17-37.
- √Fernández-Reiríz, Labarta, U. & Ferreiro, M. J. 1993. Effects of commercial enrichment diets on the nutritional value of the rotifer (*Brachionus plicatilis*). **Aquaculture.**, 112: 195-206.
- √Fernández-Reiríz, M. J., Labarta, U., Albentosa, M. & Pérez-Camacho, A. 1999. Lipid profile and growth of the clam spat, *Ruditapes decussatus* (L), fed with microalgal diets and cornstarch. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B.**, 124: 309-318.
- √Ferreira, M., Maseda, A., Fábregas, J. & Otero, A. 2008. Enriching rotifers with "Premium" microalgae. *Isochrysis* aff. *Galbana* clone T-ISO. **Aquaculture.**, 279: 126-130.
- √Ferreira, M., Coutinho, P., Seixas, P., Fábregas, J. & Otero, A. 2009. Enriching rotifers with "Premium" microalgae *Nannochloropsis gaditana*. **Mar. Biotechnol.**, 11: 585-595.
- √Ferreira, N. M. 2006. Optimización do valor nutritivo de microalgas mariñas para o enriquecemento e cultivo do rotífero *Brachionus plicatilis*. Ph D Thesis. Universidade Santiago de Compostela. 280 p.
- √Fidalgo, J. P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A. & Herrero, C. 1998. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acids profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. **Aquaculture.**, 166: 105-116.
- √Figuereido, J., Van Woesik, R., Lin, J. & Narciso, L. 2009. *Artemia franciscana* enrichment model- How to keep them small, rich and alive?. **Aquaculture.**, 294: 212-220.

- √Fiogbé, E. D. & Kestemont, P. 1995. An assessment of the protein and amino acids requirements in goldfish (*Carassius auratus*) larvae. **J. Appl. Ichthyol.**, 11: 282-289.
- √Fogg, G. E. & Thake, B. 1987. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. University of Wisconsin Press, Madison.
- √Folgar, S., Torres, E., Pérez-Rama, M., Cid, A., Herrero, C. & Abalde, J. 2009. *Dunaliella salina* as marine microalga highly tolerant to but a poor remover of cadmium. **J. Hazardous Materials.**, 165: 486-493.
- √Fontaine, C. T. & Revera, D. B. 1980. The mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* for use as food stuff in aquaculture. **World Mariculture Soc. Proc.**, 11:211-218.
- √Føyn, B. 1934. Lebenszyklus, Cytologie und Sexualitet der Chlorophyceae *Cladophora suhriana* Kützinger. **Arch. Protistenk.** 83: 1-56.
- √Frankenberger, W. T. Jr, and Benson, S. 1994. In Selenium in the Environment. W. T. Frankenberger Jr. and S. Benson, Editors, Marcel Dekker Inc.
- √Franklin, N. M., Stauber, J. L., Apte, S. C. & Lim, R. P. 2002. Effect of initial cell density of the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. **Environ. Toxicol. Chem.**, 21: 742-751.
- √Frolov, A. V., Pankov, S. L., Geradze, K. N., Pankova, S. A. & Spektorova, L. V. 1991. Influence of the biochemical composition of food on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Aquaculture.**, 97: 181-202.
- √Frolov, A. V. & Pankov, S. L. 1992. The effect of starvation on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. **J. Mar. Biol. Ass., U. K.**, 72: 343-356.
- √Fulks, W. & Main, L. 1992. Rotifer and Microalgae culture systems. Proceedings of a U. S.-Asia Workshop. The Oceanic Institute, Honolulu, HI: Argent Press. 364 pp.
- √Gadd, G. M, and Griffiths, A. J. 1978. Microorganisms and heavy metal toxicity. **Microbiol. Ecol.**, 4: 303-317 pp.
- √Gamallo, Y. 1992. Cultivo de *Artemia* sp. con microalgas marinas: crecimiento, supervivencia, reproducción y composición bioquímica. Tesis Doctoral. **Universidad Santiago de Compostela**. 189 pp.
- √Garnham, G. W., Codd, G. A., Gadd, G. M. 1992. Kinetics of uptake and intracellular location of cobalt, manganese and zinc in the estuarine green alga *Chlorella salina*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 37: 270-276 pp.
- √Gatesoupe, F. J. 1982. Nutritional and antibacterial treatments of live food organisms: the influence on survival, growth rate and weaning success of turbot (*Scophthalmus maximus*). **Ann. Zootech.**, 31: 353-368.
- √Gayral, P. and Fresnel, J. 1983. Description, sexualité et cycle de développement d'une nouvelle Coccolithophoraceae (Prymnesiophyceae): *Pleurochrysis pseudoroscoffensis* sp. nov. *Protistologica* 19, 245-261.
- √Gelabert, R. L. 2003. Bioencapsulation in *Artemia*: II. Influences of the particle concentration in the enrichment process. **Aquaculture.**, 143-153.

- √Genter, R. B. 1996. Ecotoxicological of inorganic chemical stress to algae. In : Stevenson, R. J, Bothwell, M. L., Lowe, R. L. (Eds). *Algal Ecology : Freshwater Benthic Ecosystems*. Academic, New York, USA. Pp. 403-468.
- √George, S. A., Fox, C. & Wakeman, S. 2008. Fatty acid composition of larvae of the sand dollar *Dendraster excentricus* (Echinodermata) might reflect FA composition of the diets. ***Aquaculture.***, 285: 167-173.
- √Gerloff, G. C. & Fishbeck, K. A. 1969. Quantitative cation requirements of several green and blue-green algae. ***J. Phycol.***, 5 : 109.
- √Ginzburg, M. 1987. *Dunaliella*: a green alga adapted to salt. ***Adv, Bot. Res.***14: 93-183 pp.
- √Girad, P., Falconnier, B., Bricout, J. and Vladescu, B. 1994." β -carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma*". ***Appl. Microbiol. Biotech.***, 41: 183-191.
- √Goldman, J. C., McCarthy, J. J. & Peavey, D. G. 1979. Growth rate influence on the chemical composition of phytoplankton in oceanic waters. ***Nature.***, 279: 210-215.
- √Goldman, J. C. & Peavey, D. G. 1979. Steady state growth and chemical composition of the marine chlorophyte *Dunaliella tertiolecta* in nitrogen-limited continuous culture. ***J. Appl. Environm. Microbiol.***, 38(5): 894-901.
- √Goldman, J. C. 1986. On phytoplankton growth rates and particulate C:N:P ratios at low light. ***Limnology and Oceanography*** 31 (6), 1358-1363.
- √Gordillo, F. J. L., Goutx, M., Figueroa, F. L. & Niell, F. X. 1998. Effect of light intensity, CO₂ and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. ***J. Appl. Phycol.***, 10:135-144.
- √Goss, R., Nerlich, J., Lepetit, B., Schaller, S., Vieler, A. & Wilhelm, C. 2009. The lipid dependence of diadinoxanthin de-epoxidation presents new evidence for a macrodomain organization of the diatom thylakoid membrane. ***Journal of Plant Physiology.***, 166: 1839-1854.
- √Govindjee. 2008. Recollections of Thomas John Wydrzynski. ***Photosynthesis Research.***,98(1-3): 13-31
- √Green, J. C., Perch-Nielsen, K. and Westbroek, P. 1990. Phylum Prymnesiophyta. En: Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonian, M., Chapman, D. J. (eds.), *Handbook on Protocista*. Jones and Bartlett, Boston. 293-317.
- √Green, J. C. and Parke, M. 1975. A reinvestigation by light and electron-microscopy of *Ruttenra spectabilis* Geitler (Haptophyceae), with special reference to the fine structure of the zooids. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 52, 469-474.
- √Guillard, R. R. L. & Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms I. *Gran Can.* ***J. Microbiol.***, 8: 335-343.
- √Gurr, M. I., Harwood, J. L. & Frayn, K. N. 2002. *Lipid Biochemistry*, 5th ed. Oxford, Blackwell Science, U. K.

- √Gusmão, L. F. M. & McKinnon, A. D. 2009. The effect of food type and quantity on egg production and nucleic acid content of *Acartia sinjiensis*. **Aquaculture.**, 296: 71-80
- √Gutenbrunner, S. A., Thalhamer, J. and Schmidh, A. M. M. 1994. Proteinaceous and immunochemical distinctions between the oval and fusiform morphotypes of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). **J. Phycol.**, 30: 129-136 pp.
- √Guzmán-Murillo, M. A., López-Bolaños, C. C., Ledesma-Verdejo, T., Roldan-Libenson, G., Cadena-Roa, M. A. & Ascencio, F. 2007. Effects of fertilizer-based culture media on the production of exocellular polysaccharides and cellular superoxide dismutase by *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin). **J. Appl. Phycol.**, 19: 33-41.
- √Hagiwara, A. & Hino, A. 1990. Feeding history and hatching of resting eggs in the marine rotifer *Brachionus plicatilis*. **Nippon Suisan Gakkaishi.**, 56: 1965-1971.
- √Hagiwara, A., Kotani, T., Snell, T. W., Assava-Aree, M. & Hirayama, K. 1995. Morphology, reproduction, genetics, and mating behavior of small, tropical marine *Brachionus* strains (Rotifera). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 194: 25-37.
- √Hagiwara, A., Balompapueng, M. D., Munuswamy, N. & Hirayama, K. 1997. Mass production and preservation of the resting eggs of the eurihaline rotifer *Brachionus plicatilis* and *B. rotundiformis*. **Aquaculture.**, 155: 223-230.
- √Hagiwara, A., Gallardo, W. G., Assavaaree, M., Kotaki, T. & De Araujo, A. B. 2001. Live food production in Japan: recent progress and future aspects. **Aquaculture.**, 200: 111-127.
- √Hagiwara, A., Suga, K., Akazawa, A., Kotani, T. & Sakakura, Y. 2007. Development of rotifers strains with useful traits for rearing fish larvae. **Aquaculture.**, 268: 44-52.
- √Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. 1993. Free Radicals in Biology and Medicine, Clarendon Press, Oxford, pp. 12-20.
- √Hamre, K., Holen, E. & Moren, M. 2007. Pigmentation and eye-migration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae: new findings and hypotheses. **Aquacult. Nutr.**, 13: 65-80.
- √Hamre, K. & Harboe T. 2008. *Artemia* enriched with high n-3 HUFA may give a large improvement in performance of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. **Aquaculture.**, 277: 239-243.
- √Hamre, K., Mollan, T. A., Saele, Ø. & Erstad, B. 2008. Rotifers enriched with iodine and selenium increase survival in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. **Aquaculture.**, 284: 190-195.
- √Han, K., Geurden, I. & Sorgeloos, P. 2000. Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions proving different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids. **Aquaculture.**, 183: 335-347.
- √Hansen, B., Wernberg-Møller, T. & Wittrup, L. 1997. Particle grazing efficiency and specific growth of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller). **J. Exp. Mar. Biol.**, 215: 217-233.
- √Harrison, P. J., Waters, R. E. & Taylor, J. R. 1980. A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. **J. Phycol.**, 16: 28-35.

- √Harwood, J. L. 1988. Fatty acid metabolism. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 39: 101-138.
- √Harwood, J. L. & Guschina, I. A. 2009. Review: The versatility of algae and their lipid metabolism. **Biochimie.**, xx: 1-6.
- √Healy, F. P. 1973. *Inorganic nutrient uptake and deficiency in algae*. CRC Crit. **Rev. Microbiol.**, 3: 69.
- √Heiba, H. I., Al-Easa, H. S. & Rizk, A. F. 1997. Fatty acid composition of twelve algae from coastal zones of Qatar. **Plant. Foods hum. Nutr.**, 51: 27-34.
- √Heimdal, B. R. 1993. Modern coccolithophorids. En: Marine Phytoplankton. Tomas, C. R. (ed.). Academic Press, London, 147-247.
- √Heinoman, M., Rein, D., Satue-Gracia, M. T., Huang, S. W., German, J. B. & Frankel, E. N. 1998. Effect of protein on the antioxidant activity of phenolic compounds in a lecithin-liposome oxidation system. **J. Agric. Food Chem.**, 46: 917-922.
- √Helm, M. M. & Laing, I. 1987. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W. L., Chanley (Eds.), Culture Marine Invertebrates. **Plenum Publishing Corp.** New York, pp. 29-60.
- √Herbert, D., Phipps, P. J. & Strano, R. E. 1971. Chemical analysis of microbial cells. En: "Methods in Microbiology" Norris, J. R. & Ribbons, D. W. (Eds.). Academic Press. 5B: 209-344.
- √Herrero, C.; Cid, A.; Fábregas, J, and Abalde, J. 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. **Aquacultural Engineering** 10: 99-110 pp.
- √Herzing, R. & Falkowski, P. G. 1989. Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). I. Photosynthetic energy conversion and growth efficiencies. **J. Phycol.**, 25(3): 462-471.
- √Hiawa, S. & Heerkloss, R. 1994. Experimental studies into the feeding biology of rotifers in brackish water. **Journal of Plankton Research.**, 16(8): 1021-1038.
- √Hibberd, D. J. 1981. Notes on the taxonomy and nomenclatures of the algal classes Eustigmatophyceae and Trbophyceae (synonym Xanthophyceae). Botanical Journal of the Linnean Society 82, 93-119.
- Hildebrand, M; Volcani, B. E; Gasaman, W, and Schroeder, J. I. 1997. A gene family os silicon transporters. **Nature.**, vol. 358 (6618): 688-689 pp.
- √Hirata, H. 1979. Rotifer culture in Japan. In Cultivation of Fish Fry and its Live Food (Ed. by E. Styczynska-Jurewics, T. Backiel, E. Jaspers, et al.), pp. 361-375. European Mariculture Society, Special Publication No. 4, Bredene.
- √Hirayama, K., Watanabe, T. & Kusano, T. 1973. Fundamental studies on physiology of rotifer for its Mass Culture-III. Influence of phytoplankton density on population growth. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.**, 39(11): 1123-1127.
- √Hirayama, K., Takagi, K. & Kimura, H. 1979. Nitritonal effect of eight species of marine phytoplankton on population growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Bull. Jpn. Soc. Scient. Fish.**, 45: 11-16.
- √Hirayama, K. 1990. A physiological approach to problems or mass culture of the rotifer. **NOAA Technical report** No. NMFS 85. U. S. Dept. Commerce, U.S. A.: 73-79.

- √Hirayama, K. & Satuito, C. G. 1991. The nutritional improvement of Baker's yeast for the growth of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. In: Fulks W. & K. L. Main (Eds), Rotifer and Microalgae culture systems. Proceedings of a U. S.-Asia Workshop. The Oceanic Institute, Honolulu, HI: Argent Press. 151-162.
- √Hodgson, P. A., Henderson, R. J., Sargent, J. R. & Leftley, J. W. 1991. Patterns of variation in the lipid class and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) during batch culture: I. The growth cycle. **J. Appl. Phycol.**, 3: 169-181.
- √Hoff, F. H. & Snell, T. W. 1999. Plankton Culture Manual. Fifth Edition, Florida Aqua Farms, Inc. 160 pp.
- √Høj, L., Bourne, D. G. & Hall, M. R. 2009. Localization, abundance and community structure of bacteria associated with *Artemia*: Effects of nauplii enrichment and antimicrobial treatment. **Aquaculture.**, 293: 278-285.
- √Holland, D. L. and Gabbott, P. A. 1971. A microanalytical scheme for the determination of protein, carbohydrate, lipids and RNA levels in marine invertebrate larvae. **J Mar Biol Ass U.K.** 51: 655-668.
- √Hong, H. S., Wang, M. H., Huang, X. G. & Wang, D. Z. 2009. Effects of macronutrient additions on nickel uptake and distribution in the dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* Lu. **Environmental Pollution.**, 157: 1933-1938.
- √Hontoria, F., J. C. Navarro y D. F. Amat. 1989. Utilization of *Artemia* cysts in marine larvae culture: A model of quantity evaluation. **Aquaculture Engineering.** 8: 127-138.
- √Hontoria, F., Crowe, J. H., Crowe, L. M. & Amat. F. 1994. Potential use of liposomes in larviculture as a delivery systems through *Artemia* nauplii. **Aquaculture.**, 127: 255-264.
- √Hu, C. C., Lin, J. T., Lu, F. J., Chou, F. P. & Yang, D. J. 2008. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. **Food Chemistry.**, 109: 439-446.
- √Hu, H. & Xi, Y. 2008. Demographic parameters and mixis of three *Brachionus angularis* Gosse (Rotatoria) strains fed on different algae. **Limnologica.**, 38: 56-62.
- √Huang, D., Ou, B. & Prior, L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.**, 53: 1841-1856.
- √Huang, G. H., Chen, F., Wei, D., Zhang X. W. & Chen, G. 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy.**, 87: 38-46.
- √Huang, H. L. & Wang, B. G. 2004. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao coastline. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.**, 52: 4993-4997.
- √Huang, Z., Xiang, J. J. & Guo, B. J. 2001. Research progress in physiological functions of selenoenzyme and other selenocompounds. **Progress in Physiological Sciences.**, 32: 293-297.

- √Huang, Z., Zheng, W. J. & Guo, B. J. 2002. Optimization of cultivation conditions in Se-enriched *Spirulina platensis*. **Chinese Journal of Biotechnology.**,18: 373-376.
- √Huang, Z., Guo, B. J., Wong, R. N. S. & Jiang, Y. 2007. Characterization and antioxidant activity of selenium-containing phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry.**, 100: 1137-1143.
- √Hudson, R, J. M. 1998. Which aqueous species control the rates of trace metal uptake by aquatic biota?. Observations and predictions of non-equilibrium effects. **Science of the Total Environment.**, 219: 95-115.
- √Hur, S. B. 1991. The selection of optimum phytoplankton species for rotifer culture during cold and warm seasons and their nutritional value for marine finfish larvae. In: Fulks W. & K. L. Main (Eds), Rotifer and Microalgae culture systems. Proceedings of a U. S.-Asia Workshop. The Oceanic Institute, Honolulu, Hi: Argent Press. 163-173.
- √Hussain, M. A. 2002. Studies on the calcium nutrition in marine fishes. Doctoral thesis, Kyushu University, Japan. 248 pp.
- √Hutchins, D. A., Wang, W. X. & Fisher, N. S. 1995. Copepod grazing and the biogeochemical fate of diatom iron. **Limnol. Oceanogr.**,40: 989-994.
- √Ianora, A. 2005. Birth control effects of diatom on copepod reproduction: implications for aquaculture studies. In: Lee, C. S., O'bryen, P. J., Marcus, N. H. (Eds), Copepods in Aquaculture. Blackwell Scientific Publications Ltd, Melbourne, pp, 31-48.
- √ICSH. 1988. International committee for standarization in haematology (ICSH): Selected method for platelet counting. **Labmédica** 5 (4): 25-36.
- √Iglesias, J., Fuentes, L., Sánchez, J., Otero, J. J., Moxica, C. & Lago. M. J. 2006. First feeding of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 paralarvae using *Artemia*: Effect of prey size, prey density and feeding frequency. **Aquaculture.**, 261: 817-822.
- √Imbs, A. B., Latyshev, N. A., Zhukova, N. V. & Ravishankar, G. A. 2007. Comparative opf fatty acid composition of azooxanthellate dendronephthya and zooxanthellate soft coral species. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, 148: 314-321.
- √Ito, T. 1955. Studies on the *mizukawari* in eel-culture ponds.I. The feeding activity of *Brachionus plicatilis* on phytoplankton (as a cause of *mizukawari*). **Rep. Fac. Fish. Prefect. Univer. Mie.** 2(1): 162-167.
- √Ito, T. 1957. Studies on the *mizukawari* in eel-culture ponds. VI. The relation between the growth of *Brachionus plicatilis* and the quantity of phytoplankton. **Rep. Fac. Fish. Prefect. Univer. Mie.** 2(3): 502-516.
- √Ito, T. 1960. On the culture of the mixohalino rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Muller in sea water. **Rep. Fac. Fish. Prefect. Univer. Mie.**3(3): 708-740.
- √Jeffrey, S. W, and Stauber, J. L. 1985. Photosynthetic pigments in diatoms. **Abstracts of the Second International Phycological Congress**, Copenhagen; Denmark. 74 pp.
- √Jeffrey, S. W. and Veski, M. 1997. Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. En: Phytoplankton pigments in oceanography. S. W. Jeffrey, R. F. C. Mantoura and S. W. Wright (eds.). UNESCO Publishing, Paris, 37-84.

- √Jeffrey, S. W. and Wright, S. W. 1994. Photosynthetic pigments in the Prymnesiophyceae. En: The Haptophyte Algae. Green, J. C., Leadbeater, B. S. C. (eds.). Clarendon Press, Oxford, 111-132.
- √Jia, Y., Qian, Q., Xia, J. & Yang, J. 2008. Comparative análisis to fatty acids from three diatoms by GC-MS. **Abstracts/Journal of Biotechnology.**, 136S: S558-S576.
- √Jiménez-Escrig, A., Jimenez-Jimenez, I., Pulido R. & Saura-Calixto, F. 2001. Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture.**, 81: 530-534.
- √Johnston, T. A., Wiegand, M. D., Mittermuller, S., Casselman, J. M., Pyle, G. G. & Leggett, W. C. 2008. Metal provisioning fo ova in walleye and lake whitefish. **Aquaculture.**, 281: 131-137.
- √Jones, A. and Houde, F. 1981. Mass rearing of fish fry for Aquaculture. In Book of Abstracts WCA. Italy 21-25 Septiembre.
- √Jorgensen, E. G. 1977. Photosynthesis. In. "The Biology of Diatoms". **Botanical Monographs.**, vol.13. Dietrich Werner.
- √Kafuko, T. & Ikenoue, H. (Eds). 1983. Modern methods of aquaculture in Japan. *Development in Aquaculture and Fisheries Science*, 11. Kodansha, Tokyo; Elsevier, Amsterdam.
- √Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. & Heinonen, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolics compounds. **J. Agric. Food Chem.**, 47: 3954-3962.
- √Kaixian, Q. & Borowitzka, M. A. 1992. Light and deficiency effects on the growth and composition of *Phaeodactylum tricornutum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology.**, 38: 93-103.
- √Kanazawa, A., Teshima, S., Inamori, S., Iwashita, T. & Nagao, A. 1981. Effects of phospholipids on growth survival rate and incidence of malformation in the larval ayu. **Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.**, 30: 301-309.
- √Kanazawa, A., Teshima, S. & Sakamoto, M. 1985. Effects of dietary lipids, fatty acids and phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae. **Aquaculture.**, 50:39-49.
- √Kanazawa, A. 1997. Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. **Aquaculture.**, 155: 131-137.
- √Kanazawa, A. 1993. Essential phospholipids in fish and crustaceans. In: Kaushik, S. J., Luquet, P. (Eds), Fish Nutritionin Practice. *Les Colloques* 61, Ed. INRA, Paris, pp. 519-530.
- √Kaplan, D., Richmond, A. E., Dubinsky, Z. & Aaronson, A. 1990. Algal nutrition. In: **Handbook of Microalgal Mass Culture** (Ed. A. Richmond), pp. 147-198. CRC Press, Boca Raton.
- √Kates, M. & Volcani, B. E. 1966. Lipid content of Diatoms. **Biochemica Biophysical Acta.**, 116: 264-278.

- √Katsuragi, T. & Tani, Y. 2001. Single-Cell Sorting of Microorganisms by Flow or Slide-Based (Including Laser Scanning) Cytometry. **Acta Biotechnol.**, 21(2): 99-115.
- √Kayama, M., Araki, S. & Sato, S. 1989. Lipids of marine plants. In: Ackman, R. G. (Ed) *Marine Biogenic Lipids, Fats and Oils*, Vol II. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 3-48.
- √Keller, M. D., Selvin, R. C., Claus, W. & Guillard, R. R. L. 1987. Media for the culture for oceanic ultra phytoplankton. **J. Phycol.**, 23: 633-638.
- √King, C. E. 1977. Genetics of reproduction, variation and adaptation in rotifers. **Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.**, 8: 187-201.
- √Klaveness, D. and Paasche, E. 1979. Physiology of coccolithophorids. En. *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, vol. 1. Levandowsky, M. and Hutner, S. H. (eds.). Academic Press, New York, 2nd edition, 191-213.
- √Kleppel, G. S., Hazzard, S. E. & Burkart, C. A. 2005. Maximising the nutritional values of copepods un aquaculture: managed versus balanced nutrition. In: Lee, C. S., O'Bryen, P. J., Marcus, N. H. (Eds), *Copepods in Aquaculture*. Blackwell Scientific Publications Ltd, Melbourne, pp. 49-59.
- √Klotz, L. O., Kroncke, K. D., Buchczyk, D. P. & Sies, H. 2003. Role of cooper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. **J. Nutr.**, 133: 1448S-1451S.
- √Kochert, G. 1978. Carbohydrate determination by the phenol – sulphuric acid method. En: "Handbook of phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods". Hellebust, J. A., Craigie, J. S. (Eds.): 95-97. Cambridge University press. London.
- √Korstad, J., Olsen, Y. & Vadstein, O. 1989. Life history characteristics of *Brachionus plicatilis* (Rotifera) fed different algae. **Hydrobiologia.**, 186/187: 43-50.
- √Koste, W. 1980. *Brachionus plicatilis*, ein Salzwasser-radertier. **Mikrokosmos.**, 5: 148-155.
- √Kostopoulou, V. & Vadstein, O. 2007. Growth performance of the rotifers *Brachionus plicatilis*, B. "Nevada" and *Brachionus* "Cayman" under different food concentracions. **Aquaculture.**, 273: 449-458.
- √Koven, W., Van Anholt, R., R., Lutzky, S., Ben-Atia, I., Gamsiz, K., Weiss, R. & Tandler, A. 2001. The importance of arachidonic acid as a modulator of stress resistance through the hypothalamus-pituitary-interrenal axis, in different-aged gilthead seabream larvae. In: Hendry, C. I., Van Stappen, G., Wille, M., Sorgeloos, P. (Eds), *Larvi 2001: 3rd Fish and Shellfish Larviculture Symposium*, Gent, Belgium, September 3-6, 2001. European Aquaculture Society, Special Publication, Vol. 30. Oostende Belgium.
- √Kraul, S. 1993. Larviculture of the mahimahi *Coryphaena hippurus* in Hawaii, USA. **J. World Aquacult. Soc.**, 24: 410-421.
- √Krebs, C. J. 1985. Ecology; the experimental analysis of distribution and abundance, 3rd Ed. Harper and Row, New York.
- √Kroth, P. G., Chiovitti, A., Gruber, A., Martin-Jezequel, V., Mock, T., Parker, M. S., Stanley, M. S., Kaplan, A., Caron, L., Weber, T. & Maheswari, U. 2008. A model for

- carbohydrate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* deduced from comparative whole genome analysis. **PLoS ONE** 3:e1426.
- √Kuda, T., Tsunekawa, M., Hishi, T. & Araki, Y. 2005. Antioxidant properties of dried "kayamo-nori", a brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). **Food Chemistry**, 89: 617-622.
- √Kyllin, A. & Das, G. 1967. Calcium and strontium as micronutrients and morphogenic factors for *Scenedesmus*. **Phycologia**, 6: 201.
- √Laing, I. & Jones, E. 1983. Large-scale turbidostat culture of marine microalgae. **Aquaculture Engineering**, 2: 203-212.
- √Laing, I. 1985. Factors affecting the large-scale production of four species of commercially important marine microalgae. **Aquaculture**, 44: 161-166.
- √Laing, I. & Jones, E. 1988. A turbidostat vessel for the continuous culture of marine microalgae. **Aquaculture Engineering**, 7: 89-96.
- √Lall, S. P. 2002. The minerals. In: Halver, J. E., Hardy, R. W. (Eds.), *Fish Nutrition*, 3rd ed. Academic Press, San Diego, CA, pp. 259-308.
- √Lall, S. P. & Lewis-McCrea, L. M. 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish-An overview. **Aquaculture**, 267: 3-19.
- √Laurenco, S. O., Barbarino, E., Mancini-Filho, J., Schinke, K.P. & Aidar, E. 2002. Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: and evaluation for aquaculture. **Phycologia**, 41: 158-168.
- √Lavens, P. & Sorgeloos, P. 2000. The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. **Aquaculture**, 181:397-403 p.
- √Lavens, P., Coutteau, P. & Sorgeloos, P. 1995. Laboratory and field variation in HUFA enrichment of *Artemia* nauplii. In: *Larvi'95*, Book of Abstracts (Ed. By P. Lavens, E. Jaspers & I. Roelants), pp. 137-140. European Aquaculture Society, Special Publication No. 24, Ghent.
- √Laws, E. A. & Wong, D. C. L. 1978. Studies of carbon and nitrogen metabolism by three marine phytoplankton species in nitrate-limited continuous culture. **J. Phycol.**, 14: 406-416.
- √Laws, E. A. & Bannister, T. T. 1980. Nutrient and light limited growth of *Thalassiosira fluviatilis* in continuous culture, with implications for phytoplankton growth in the ocean. **Limnol. Oceanogr.**, 25: 457-473.
- √Lebeau, T, and Robert, J. M. 2003. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: Current and putative products. **Appl. Microbiol. Biotech.**, 60 (6): 624-632 pp.

- √Lee, B. G. & Luoma, S. N. 1998b. Bioavailability of Cd, Cr, and Zn to bivalves during a phytoplankton bloom in San Francisco Bay. **Limnol. Oceanogr.**, 43.
- √Lee, B. G. & Luoma, S. N. 1998. Influence on microalgal biomass on absorption efficiency of Cd, Cr and Zn by two bivalves from San Francisco Bay. **Limnology and Oceanography**, 44: 556-572.
- √Lee, C. S. & Ostrowski, T. 2001. Current status of marine finfish larviculture in the United States. **Aquaculture**, 200: 89-110.
- √Lee, K. W., Park, H. G., Lee, S. M. & Kang, H. K. 2006. Effects of diets on the growth of the brackish water cyclopoid copepod *Paracyclops nana* Smirnov. **Aquaculture**, 256: 346-353.
- √Lee, S. E., Hwang, H. J., Ha, J. S., Jeong, H. S. & Kim, J. H. 2003. Screening of medical plant extracts for antioxidant activity. **Life Sciences**, 9368: 1-13.
- √Lee, W. Y. & Wang, W. X. 2001. Metal accumulation in the green macroalga *Ulva fasciata*: effects of nitrate, ammonium and phosphate. **Science of the Total Environment**, 278: 11-22.
- √Lee, Y. K. and Ding, S.Y. 1994. "Cell cycle and accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta)." **Journal of Phycology** 30(3): 445-449.
- √Léger, P., Bengtson, D. A., Simpson, K. L. Sorgeloos, P. 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.**, 24: 521-523.
- √Léger, P., D. A. Bengtson, P. Sorgeloos, K. L. Simpson y A. D. Beck. 1987. The nutritional value of *Artemia*: a review. En: Sorgeloos, P., Bengtson., Decler, W. y Jaspers, E. (Eds.). *Artemia* Research and Its Applications. Vol. 3. Use in aquaculture. Universa Press, Watteren, Belgium.
- √Legrand, C; Hussenot, J; Rince, Y; Joassard, L; Mornet, F, and Pirastru, L. 1991. Mass production of microalgae in salt pond (I'Houmeau-France) with farm fertilizer (diammonium phosphate) in addition with silicon. **Aquaculture and the Environment**. DePauw, N; Joyce, J. Comps. No. 14, 187-188 pp.
- √Lei, A; Hu, Z; Wong, Y; & Tam, N. F. 2006. Antioxidant responses of microalgal species to pyrene. **Journal of Applied Phycology** 18: 67-78.
- √Levander, O. A. 1986. Selenium, In Merts, W. (Ed), 5th edn. Trace elements in Human and Animal Nutrition, vol 2. Academic Press, San Diego California, pp. 209-279.
- √Levine, D. 1983. The design and development of microencapsulated diet for the study nutritional. In culture of marine invertebrate. (Ed.) Hutchinson Ross. 386 p.
- √Lewin, J. C. 1958. The taxonomic position of *Phaeodactylum tricornutum*. **J. Gen. Microbiol.**, 18: 427-432 pp.
- √Li, H. B., Chen, F., Zhang, T. Y., F. Q. & Xu, G. Q. 2001. Preparative isolation and purification of lutein from microalga *Chlorella vulgaris* by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, 905: 151-155.

- √Li, H. B; Cheng, K. W; Wong, C. C; Fan, K. W; Chen, F, & Jiang, Y. 2007. Evaluation of Antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food Chemistry** 102: 771-776.
- √Li, Y., Veilleux, D. J. & Wikfors, G. H. 2009. Particle removal by Northern bay scallops *Argopecten irradians irradians* in a semi-natural setting: Application of a flow-cytometric technique. **Aquaculture**, 296: 237-245.
- √Li, Z. Y., Guo, S. Y. & Li, L. 2003. Bioeffects of selenite on the growth of *Spirulina platensis* and its biotransformation. **Bioresource Technology**, 89: 171-176.
- √Liao, C., Su, H. M. & Chang, E. Y. 2001. Techniques in finfish larviculture in Taiwan. **Aquaculture**, 200: 1-31.
- √Lie, O., Haaland, H and Hemre, G. I. 1997. Nutritional composition of rotifers following a change in diet from yeast and emulsified oil to microalgae. **Aquaculture International**, 5: 427-438.
- √Lim, S. N., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C. & Ang, P. O. 2002. Evaluation of antioxidant activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. **J. Agric. Food Chem.**, 50: 3862-3866.
- √Lin, D. S., Ilias, A. M., Connor, W. E., Caldwell, R. S., Cory, H. T. & Dave, G. D. 1982. Composition and biosynthesis of sterols in selected marine phytoplankton. **Lipids**, 17: 818-824.
- √Lin, Y. H., Chang, F. L., Tsao, C. Y. & Leu, J. Y. 2007. Influence of growth phase and nutrient source on fatty acid composition of *Isochrysis galbana* CCMP 1324 in batch photoreactor. **Biochemical Engineering Journal**, 37: 166-176.
- √Liu, Z. Y., Wang, G. C. & Zhou, B. C. 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, 99: 4717-4722.
- √Lopes de Silva, T., Santos, C. A. & Reis, A. 2010. Multi-parameter Flow Cytometry as a Tool to Monitor Heterotrophic Microalgal Batch Fermentations for Oil Production Towards Biodiesel. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 14: 330-337.
- √Lora-Vilchis, M. C., Cordero-Esquivel, B & Voltolina, D. 2004. Growth of *Artemia franciscana* fed *Isochrysis* sp and *Chaetoceros muelleri* its early life stages. **Aquaculture Research**, 35: 1086-1091.
- √Los, D. A. & Murata, N. 2004. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes** 1666: 142-157.
- √Lowry, O. H., Rosebrough, H. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. **J Biol Chem** 193: 265-275.
- √Lubzens, E., Marko, A. & Tietz, A. 1985. Lipid Synthesis in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Israel Oceanographic and Limnological Research*, 201-210.
- √Lubzens, E. 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. **Hydrobiologia**, 147: 245-255.
- √Lubzens, E. & Minkoff, G. 1988. Influence of the age of algae feed to rotifers (*Brachionus plicatilis* O. F. Muller) on the expression of mixis in their progenies. **Oecología**, 76: 430-435.
- √Lubzens, E., Tandler, A. & Minkoff, G. 1989. Rotifers as food in aquaculture. **Hydrobiologia**, 186/187: 387-400.

- √Lubzens, E., Gibson, O., Zmora, O. and Sukenik, A. 1995. Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. **Aquaculture** 133: 295-309.
- √Lubzens, E., Minkoff, G., Zmora, O. & Barr, Y. 1997. Mariculture in Israel-past achievements and future directions in raising rotifers as food for marine fish larvae. **Hydrobiologia.**, 358: 13-20.
- √Lubzens, E., Zmora, O. & Barr, Y. 2001. Biotechnology and aquaculture of rotifers. **Hydrobiologia.**, 446/447: 337-353.
- √Lubzens, E. & Zmora, O. 2003. Production and Nutritional Value of Rotifers. Charter 2. In: Søttrup J. G. and McEvoy, L. A. (Eds), Live feeds in marine aquaculture. Blackwell Publishing. 17-64.
- √Luna-Andrade, A., Aguilar-Duran, R., Nandini, S. & Sarma, S. S. S. 2002. Combined effects of copper and microalgal (*Tetraselmis suecica*) concentrations on the population growth of *Brachionus plicatilis* Müller (Rotifera). **Water, Air, and Soil Pollution.**, 1: 1-11.
- √Ma, Z. J. & Yamaguchi, M. 2001. Role of endogenous zinc in the enhancement of bone protein synthesis associated with bone growth of newborn rats. **J. Bone Miner. Metab.**, 19: 34-44.
- √Maage, A. 1994. Trace elements in Atlantic salmon *Salmo salar* nutrition. Ph D. Thesis. University of Bergen, Bergen, Norway, 210 p.
- √Makridis, P. & Olsen, Y. 1999. Protein depletion of the rotifer *Brachionus plicatilis* during starvation. **Aquaculture.**, 174: 343-353.
- √Makridis, P., Fjellheim, A. J., Skjermo, J. & Vadstein, Ø. 2000. Control of the bacterial flora of *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions. **Aquaculture.**, 185: 207-218.
- √Makridis, P., Moreira, C., Alves Costa, R., Rodrigues, P. & Dinis, M. T. 2009. Use of microalgae bioencapsulated in *Artemia* during the weaning of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). **Aquaculture.**, 292: 153-157.
- √Mandalam-Ramkumar, K, and Palsson-Bernhard, O. 1998. Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures. **Biotech. Bioengineering.** 59 (5): 605-611 pp.
- √Manduzio, H., Monsinjon, T., Rocher, B., Leboulenger, F. & Galap, C. 2003. Characterization of an inducible isoform of the Cu/Zn superoxide dismutase in the blue mussel *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology.**, 64: 73-83.
- √Markovits, A., López, L., Costa, E. & Lutz, M. 1991. Microalgas como Alimento Humano Potencial (I). Evaluación Química y Biológica de *Phaeodactylum tricornutum*. **Alimentación Equipos y Tecnología.**, 87: 119-123.
- √Marschner, H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press. 243 pp.
- √Marsh, J. B. y Weinstein, D. B. 1966. Simple charring method for determination of lipids. **J Lipid. Res.**, 7: 574-576.
- √Marsot, P., Houle, L. & Blais, C. 1987. Yields and biological characteristics of continuous dialysis culture of *Phaeodactylum tricornutum* operating at different dilution rates. **Aquaculture.**, 67: 353-368.

- √Marsot, P., Cembella, A. D. & Houle, L. 1991. Growth kinetics and nitrogen-nutrition of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* in continuous dialysis culture. **J. Appl. Phycol.**, 3:1-10.
- √Marte, C. L. 2003. Larviculture of marine species in Southeast Asia: current research and industry prospects. **Aquaculture.**, 227: 293-304.
- √Martínez-Díaz, S. F., Moreno-Legorreta, M., Vázquez-Juárez, R. & Barrios-González, J. 2003. Elimination of the associated microbial community and bioencapsulation of bacteria in the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Aquacult. Int.**, 11: 95-108.
- √Mata, T., Martins, A. A. & Caetano, N. S. 2010. Microalgal for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews.**, 14: 217-232.
- √Matsukawa, R., Dubinsky, Z., Kishimoto, E., Masaki, K., Masuda, Y., Takeuchi, T., Chihara, M., Yamamoto, Y., Niki, E. & Karube, I. 1997. A comparison of screening methods for antioxidants activity in seaweeds. **J. Appl. Phycol.**, 9: 29-35.
- √Matsumoto, S., Satoh, S., Kotani, T. & Fushimi, H. 2009. Examination of a practical method for zinc enrichment of euryhaline rotifers (*Brachionus plicatilis*). **Aquaculture.**, 286: 113-120.
- √McCarthy, J. J. 1980. Nitrogen, Chapter 5. In: Studies in Ecology Volume 7. "The Physiological Ecology of Phytoplankton". Ed Morris, I. University of California Press. Pp. 191-233.
- √McCausland, M. A., Brown, M. R., Barrett, S. M., Diemar, J. A. & Heasman, M. P. 1999. Evaluation of live microalgae and microalgal pastes as supplementary food for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture.**, 174: 323-342.
- √McEvoy, L. A., Navarro, J. C., Hontoria, F., Amat, F. & Sargent, J. R. 1996. Two novel *Artemia* enrichment diets containing polar lipid. **Aquaculture.**, 144: 339-352.
- √McEvoy, L., Estevez, A., Bell, J. G., Shields, R. J., Gara, B., Sargent, J. R. 1998. *Proceedings of the Live Feeds. Aquaculture Canada*. No. 98-4, 17-20 pp.
- √McEvoy, L. A., Naess, T., Bell, J. G. & Lie, O. 1998b. Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmentation Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed enriched *Artemia*: a comparison with fry fed wild copepods. **Aquaculture.**, 163: 237-250.
- √McKeown, B. and Mariñas, B. 1986. The Chemistry of Selenium in an Aqueous Environment. In the Proceedings of the First Environmental Symposium on Selenium in the Environment. June 10-12, 1985. CATI, Fresno, California, 7-15 pp.
- √Medina-Reyna, C. E., Pedroza-Islas, R., Ronsón-Paulín, J. A., Santiago-Morales, S. I. & Jacinto-Nolasco, P. 2002a. Partial substitution of microalgae for microcapsules prepared with sub-products of artisanal fishery in the zoea development of *Litopenaeus vannamei*. **World Aquaculture Society.**
- √Medina-Reyna, C. E., Jacinto-Nolasco, P., Pedroza-Islas, R., Santiago-Morales, S. I. & Ronsón-Paulín, J. A. 2002b. Sustitución de microalgas en el cultivo larvario de camarón blanco por microcapsulas a base de un subproducto del barrilete negro. **Ciencia y Mar.**, 6(18): 19-30.

- √Medina-Reyna, C. E., Hernández-Rojas, F., Jacinto-Nolasco, P., Pedroza-Islas, R., Santiago-Morales, S. I. & Ronsón-Paulín, J. A. 2002c. Evaluación de micropartículas a partir de proteínas concentradas del suero de leche en la sustitución total de microalgas para zoeas de camarón blanco. **Ciencia y Mar.**, 6(18): 33-44.
- √Medina-Reyna, C. E., Ronsón-Paulín, J. A., Santiago-Morales, I., Pedroza-Islas, R. & Lazo, J. P. 2004. Evaluation of a spray-dried microparticle containing black skipjack tuna orbital oil for the enrichment of *Artemia* nauplii. **European Aquaculture Society, Special Publication.**, 34: 556-557.
- √Medina-Reyna, C. E., Ronsón-Paulín, J. A., Hernández-Rojas, F., Santiago-Morales, I., Pedroza-Islas, R. & Vernon-Carter, E. J. 2005. Dual Benefits of Whey Protein Concentrate in the Microencapsulated Diet of Larval White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal World Aquaculture Society.**, 36(3): 401-410.
- √Merchie, G.; Lavens, P.; Dhert, P.; Gomez, M.G.U.; Nelis, H.; De-Leenheer, A.; Sorgeloos, P. 1996. "Dietary ascorbic acid requirements during the hatchery production of turbot larvae". **J. Fish. Biol.** Vol. 49, no. 4, 573-583 pp.
- √Mikami, K. & Murata, N. 2003. Membrane fluidity and the perception of environmental signals in cyanobacteria and plants. **Progress in Lipid Research.**, 42: 527-543.
- √Milione, M. & Zeng, C. 2007. The effects of algal diets on population growth and egg hatching success of the tropical calanoid copepod, *Acartia sinjiensis*. **Aquaculture.**, 273: 656-664.
- √Milne, P. H. 1972. Fish and shellfish farming in coastal waters. Fishing News (Booh) Ltd Ed; Londres, 208 p.
- √Minkoff, G. 1989. "The effect of secondarily enrich rotifers on growth and survival of marine fish larvae". **Diss. Abst. Int. PT. B-SCI and ENG.** Vol. 49, no.11, 183 pp.
- √Miracle, M. R. & Serra, M. 1989. Salinity and temperature influence on rotifer life history characteristics. **Hydrobiologia.**, 186/187: 81-103.
- √Mirón, A. S., García, M., Gómez, A., Camacho, F., Grima, E. & Chisti, Y. 2002. Shear stress tolerante and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactor. **Biochem. Eng. J.**, 16: 287-297.
- √Moal, j., Martin-Jezequel, V., Harris, R. P., Samain, J. F. & Poulet, S. A. 1987. Interspecific and intraspecific variability of the chemical composition of marine phytoplankton. **Oceanol. Acta.**, 10:339-346.
- √Molina Grima, E., Sánchez Pérez, J. A., García Sanchez, J. L., García Camacho, F., & López Alonso, D. 1992. EPA from *Isochrysis galbana*. Growth conditions and productivity. **Process. Biochem.**, 27: 299-305.
- √Molina Grima, E., Sánchez Pérez, J. A., García Camacho, F., García Sanchez, J. L. & López Alonso, D. 1993. n-3 PUFA productivity in chemostat cultures of microalgae. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 38: 599-605.

- √Molina Grima, E., Sánchez Pérez, J. A., García Camacho, F., García Sanchez, J. L., Acien Fernández, G. & López Alonso, D. 1994. Outdoor culture of *Isochrysis galbana* ALII4 in a closed tubular photobioreactor. **J. Biotechnol.**, 37: 159-166.
- √Molina Grima, E., Sánchez Pérez, J. A., García Camacho, F., Acien Fernández, F. G., Fernández Sevilla, J. M. & Valdés Sanz, F. 1994b. Effect of dilution rate on eicosapentaenoic acid productivity of *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 in outdoor chemostat culture. **Biotechnol. Lett.**, 16(10): 1035-1040.
- √Molina Grima, E., Sánchez Pérez, J. A., García Camacho, F., Robles Medina, A., Giménez Giménez, A. & López Alonso, D. 1995. The production of polyunsaturated fatty acids by microalgae: from strain selection to product purification. **Process. Biochem.**, 30:711-719.
- √Molina Grima, E., Acien Fernández, F. G. & Chisti, Y. 2001. Tubular photobioreactor design for algal cultures. **J. Biotechnol.**, 92: 113-131.
- √Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, 26(2): 211-219.
- √Monroig, O., Navarro, J. C., Amat, I., Gonzalez, P., Amat, F. & Hontoria, F. 2003. Enrichment of *Artemia* nauplii in PUFA, phospholipids, and water-soluble nutrients using liposomes. **Aquac. Int.**, 11: 151-161.
- √Monroig, O., Navarro, J. C., Amat, F., Gonzalez, P., Bermejo, A. & Hontoria, F. 2006. Enrichment of *Artemia* nauplii in essential fatty acids with different types of liposomes and their use in the rearing of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. **Aquaculture**, 251: 491-508.
- √Montsant, A., Jabbari, K., Maheswari, U. & Bowler, C. 2005. Comparative genomics of the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Plant. Physiol.**, 137: 500-513.
- √Morel, N. M. L; Rueter, J. G; and Morel, F. M. M. 1978. Copper toxicity to *Skeletonema costatum*. **J. Phycol.**, 14: 43-48 pp.
- √Moreno-Garrido, I., Blasco, J., González-DelValle, M. & Lubián, L. M. 1998. Difference in copper accumulation by the marine microalga *Nannocloropsis gaditana* Lubián, submitted to two different thermal treatments. **Ecotoxicol. Environ. Rest.**, 1(1): 43-47.
- √Moreno-Garrido, I., Lubián, L. M. & Soares, A. M. 1999. In vitro populations of rotifer *Brachionus plicatilis* Müller demonstrate inhibition when fed with copper-preaccumulating microalgae. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 44: 220-225.
- √Moreno-Garrido, I., Lubián, L. M. & Soares, A.M.V.M. 2000. Influence of cellular density in determining of EC₅₀ in microalgal growth inhibition tests. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 47: 112-116.
- √Mourete, G., Lubián, L. M. & Odriozola, J. M. 1990. Total fatty acid composition as a taxonomic index of some marine microalgae used as food in marine aquaculture. **Hydrobiologia**, 203: 147-154.
- √Mourete, G., Rodriguez, A. & Sargent, J. R. 1993. Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA;22:6n-3) on lipid and fatty acid composition and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae during first feeding. **Aquaculture**, 112: 79-98.

- √Mourete, G., Medina, A., Gonzalez, S. & Rodríguez, A. 1995. Variation in lipid content and nutritional status during larval development of the marine shrimp *Penaeus berathurus*. **Aquaculture**, 130: 187-199.
- √Muller-Feuga, A., Moal, J and Kaas, R. 2003. The Microalgae of Aquaculture. En: Live feeds in marine aquaculture. Støttrup, J. G. and McEvoy, L. A. (Eds.). Blackwell Publishing, Oxford, 1-16.
- √Muniz-Rossa, M., Cabral de Oliveira, M., Okamoto, O. K., Lopes, P. F. & Colepicolo, P. 2002. Effect of visible light on superoxide dismutase (SOD) activity in the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). **J. Appl. Phycol.**, 14: 151-157.
- √Murthy, S. D. S., Bukhov, N. G. & Mohanty, P. 1990. Mercury induced alterations of chlorophyll *a* fluorescence kinetics in cyanobacteria: multiple effects of mercury on electron transport. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology**, 6: 373-380.
- √Mysklestad, S. 1974. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. I. Comparison of nine different species in culture. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 15: 261-274.
- √Nagata, W. D. & White, J. N. C. 1992. Effect of yeast and algal diets on the growth and biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller) in culture. **Aquacult. Fish. Manage.**, 23: 13-21.
- √Nahas, R; Abatis, D; Anagnostopoulou, M. A; Kefalas, P; Vagias, C; & Roussis, V. 2007. Radical-scavenging activity of Aegean Sea marine algae. **Food Chemistry** 102: 577-581.
- √Napolitano, G. E., Ackman, R. G. & Ratnayake, W. M. N. 1990. Fatty acids composition of three cultured algal species (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* and *Chaetoceros gracilis*) used as food for bivalve larvae. **J. World Aquaculture Society**, 21: 122-130.
- √Narciso, L. 2000. Biologia e Cultivo de *Artemia* SP. (Crustácea, Branchiopoda); sua Utilização em Aquacultura. Premio do Mar Rei D. Carlos 1998. Câmara Municipal de Cascais. 94 pp.
- √National Research Council . 1977. Nutrient Requirements of warmwater fishes. National Acad Press. Washington D. C. 78 pp.
- √Navarro, J. C., Henderson, R. J., McEvoy, L. A., Bell, M. V. & Amat, F. 1999. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. **Aquaculture**, 174: 155-166.
- √Navarro, J. & Villanueva, R. 2003. The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: deviation from their natural fatty acid profile. **Aquaculture**, 219: 613-631.
- √Nelson, M. M., Crear, B. J., Nichols, P. D. & Ritz, D. A. 2004. Growth and lipid composition of phyllosomata of the southern rock lobster, *Jasus edwardsii*, fed enriched *Artemia*. **Aquaculture Nutrition**, 10: 237-246.
- √Nevejan, N., Saez, I., Gajardo, G. & Sorgeloos, P. 2003. Energy vs Essential fatty acids: what do scallop larvae (*Argopecten purpuratus*) need most?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, 134: 599-613.

- √Nguyen, V. T., Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H. & Kotani, T. 2008. Effect of zinc and manganese supplementation in *Artemia* on growth and vertebral deformity in red sea bream (*Pagrus major*) larvae. **Aquaculture.**, 285: 184-192.
- √Nimura, Y. 1963. Effects of different concentrations of *Chlamydomonas* on the grazing and growth of *Artemia* sp with reference to the salinity of its living medium. **Bull. Jap. Soc. Sc. Fish.**, 29:423-433.
- √Nimura, Y.1980. Retarded growth of *Artemia salina* by overfeeding. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.**, 46(6): 681-687.
- √Nimura, Y., Nanba, K. & Miah, M. I. 1994. Food utilisation in *Artemia* for growth, reproduction and maintance. **Fish. Sci.**, 60(5): 493-503.
- √Nordgreen, A., Hamre, H. & Langdon. C. 2007. Development of lipid microbeads for delivery of lipid and water-soluble materials to *Artemia*. **Aquaculture.**, 273: 614-623.
- √Nuzzi, R. 1972. Toxicity of mercury to phytoplankton. *Nature* 237;38-39 pp.
- √O'Kelley, J. C. 1974. Inorganic nutrients, Charper 22. In: *Algal physiology and biochemistry*. Ed. Stewart, W. D. P. University of California Press. Pp. 610-635.
- √Odum, E. P. 1971. *Fundamentals of Ecology*. 3a. Ed. W. B. Saunders C., Filadelfia.
- √Øie, G., Makridis, O., Reitan, K. J. & Olsen, Y. 1997. Protein and carbon utilization of rotifers (*Brachionus plicatilis*) in first feeding of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture.**, 153: 103-122.
- √Øie, G. and Olsen, Y. 1997. Protein and lipid content of the rotifer *Brachionus plicatilis* during variable growth and feeding condition. *Hydrobiologia* 358, 251-258.
- √Okauchi, M., Zhou, W. J., Zou, W. H., Fukusho, K. and Kanazawa, A. (1990). Difference in nutritive value of a microalga *Nannochloropsis oculata* at various growth phases. *Nippon Suisan Gakkaishi Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 56 (8): 1293-1298.
- √Olsen, A. I., Jensen, A., Evjemo, J. O. & Olsen Y. 1997. Effect of algal addition on stability of fatty acids in enriched *Artemia franciscana*. **Hydrobiologia.**, 358: 205-210.
- √Olsen, Y., Reitan, K. I. & Vadstein, O. 1993. Dependence of temperature on loss rates of rotifers, lipids and ω 3 fatty acids in starved *Brachionus plicatilis* cultures. **Hydrobiologia.**, 255/256: 13-20.
- √Osborne, B. A. & Geider, R. J. 1986. Effect of nitrate-nitrogen limitation on photosynthesis of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (Bacillariophyceae). **Plant. Cell. Environ.**, 9: 617-625.
- √Otero, A. 1994. Modificación de la Composición Bioquímica de Microalgas Marinas en Régimen de Ciclostato. Tesis Doctorado, Facultad de Biología, Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Santiago de Compostela. 163 p+ adenda.
- √Otero, A. & Fábregas, J. 1997. Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. **Aquaculture** 159: 111-123.
- √Otero, A., García, D. and Fábregas, J. 1997b. Factors controlling eicosapentaenoic acid production in semicontinuous cultures of marine microalgae. **J. Appl. Phycol.** 9: 465-469.

- √Otero, A., García, D., Morales, E. D., Arán, J. and Fábregas, J. 1997a. Manipulation of the biochemical composition of the eicosapentaenoic acid-rich microalga *Isochrysis galbana* in semicontinuously cultures. **Biotech. Appl. Biochem.** 26: 171-177.
- √Otero, A., Domínguez, A., Lamela, T., García, D. and Fábregas, J. 1998. Steady-states of semicontinuous cultures of a marine diatom: effect of saturating nutrient concentrations. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 227: 23-34.
- √Otero, A; Arredondo-Vega, B. O., Patiño, M, Lamela, T; Fábregas, J. 1995. Production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in semicontinuous cultures of marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **J. Mar. Biotechnol.** 3: 82-85 pp.
- √Oudot-Le Secq, M. O., Grimwood, J., Shapiro, H., Armbrust, E. V., Bowler, C. & Green, B. R. 2007. Chloroplast genomes of the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*: comparison with other plastid genomes of the red lineage. **Mol. Genet. Genomics.**, 277: 427-439.
- √Park, H. G., Puvanendran, V., Kellet, A., Parrish, C. C. & Brown, J. A. 2006. Effect of enriched rotifers on growth, survival, and composition of larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Journal of Marine Science.**, 63: 285-295.
- √Parrish, C. C. & Wangersky, P. J. 1987. Particulate and dissolved lipid classes in cultures of *Phaeodactylum tricornutum* grown in cage culture turbidostats with a range of nitrogen supply rates. **Mar. Ecol.Prog. Ser.**, 35: 119-127.
- √Parsons, T. R., Stephens, K. & Strickland, J. D. H. 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankton. **J. Fish. Res. Bd. Can.**, 18: 1001-16.
- √Patiño, M. B. 1995. Nutrición de *Brachionus plicatilis* y *Artemia sp.* con microalgas marinas. Tesis Doctoral, Universidade de Santiago de Compostela, España. 192 pp.
- √Pennarun, A. L., Prost, C., Haure, J. & Demaimay. M. 2003. Comparison of two Microalgal Diets. 1. Influence on the Biochemical and Fatty Acid Composition of Raw Oysters (*Crassostrea gigas*). **J. Agric. Food Chem.**, 51: 2006-2010.
- √Persoone, R. 1978. The generation 1977 a Turbot (*S. Maximus*). Comité des poissons de fond et de mariculture G. 55. 29p.
- √Peterson, S. L; Bennett, L. G, and Tornabene, T. G. 1975. Effects of lead on the lipid composition of *Micrococcus* cells. **Appl. Microbiol.**, 29: 669-679 pp.
- √Phillips, G. R. and Buhler, D. R. 1978. The relative contribution of methyl-mercury from food or water to rainbow trout in a controlled laboratory experiment. **Trans. Am. Fish. Soc**; 107: 853-861 pp.
- √Piorreck, M. & Phol, P. 1984. Formation of biomass, total protein, Chlorophylls, lipids and fatty acids in green and blue-green algae during one growth phase. **Phytochemistry.**, 23 : 217-223.
- √Pratoomyot, J., Srivilas, P. & Noiraksar, T. 2005. Fatty acids composition of 10 microalgal species. **Songklanakarín J. Sci. Technol.**, 27(6): 1179-1187.
- √Premazzi, G, Buonaccorsi, G. & Zilio, P. 1989. Flow cytometry for algal studies. **Water Research.**, 23: 431-442.

- √Purdom, C. E; Jones, A. 1972. " Cultivation trials with turbot (*Scophthalmus maximus*) ". **Aquaculture**, 1 (2): 213-230 pp.
- √Qi, Z., Dierckens, K., Defoirdt, T., Sorgeloos, P., Boon, N., Bao, Z. Bossier, P. 2009. Analysis of the evolution of microbial communities associated with different culture of rotifer strains belonging to different cryptic species of the *Brachionus plicatilis* species complex. **Aquaculture**, 292: 23-29.
- √Quaid, H. & Richmond, A. 1993. Optimization of growth and productivity of *Isochrysis galbana* in outdoor column reactor. Algal Biotechnology. *Progress in Biotechnology of Photoautotrophic Microorganisms*. **6th International Conference on Applied Algology**. Czech Republic. p 78.
- √Rachlin, J. W., Jensen, T. E. & Warkentine, B. 1982. Utilization of morphometric analysis in evaluating response of *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) to exposure to eight heavy metals. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 11: 323-333.
- √Rainuzzo, J. R.; Reitan, K. I., Joergensen, L.; Olsen, Y. 1994. " Lipid composition in turbot larvae fed live feed culture by emulsions of different lipid classes." **Comp. Biochem. Physiol.**A. Vol. 107A, no.4 699-710 pp.
- √Rainuzzo, J. R.; Reitan, K. I., Olsen, Y. 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. **Aquaculture**, 155: 103-115.
- √Rana, S. V. S. & Boora, P. R. 1992. Antiperoxidative mechanism offered by selenium against liver injury caused cadmium and Mercury in rat. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 48: 120-124.
- √Rana, S. V. S. & Verma, S. 1997. Protective effects of GSH, α -tocopherol, and selenium on lípido peroxidation in liver and kidney of copper fed rats. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 59: 152-158.
- √Reader, S., Marion, M. & Denizeau, F. 1993. Flow citometric analysis of the effects of tri-*n*-butylin chloride on cytosolic free calcium and thiol levels in isolated rainbow trout hepatocytes. **Toxicology**, 80: 117-129.
- √Rebollosa Fuentes, M. M., Acién Fernández, G. G., Sánchez Pérez, J. A. & Guil Guerrero, J. L. 2000. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. **Food Chemistry**, 70: 345-353.
- √Reed, R. H, and Gadd, G. M. 1990. Metal tolerance in eukaryotic and prokaryotic algae. In: Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. Shaw, J. Ed. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, USA, 105.118 pp.
- √Reeve, M. R. 1963. Growth efficiency in *Artemia* under laboratory conditions. **Biol. Bull. Mar. Biol.**, 125: 133-145.
- √Regnault, A., Chervin, D., Chammal, A., Piton, F., Calvayrac, R. & Mazliak, P. 1995. Lipid composition of *Euglena gracilis* in relation to carbon-nitrogen balance. **Phytochemistry**, 40: 725-733.
- √Reinfelder, J. R; Fisher, N. S., Luoma, S. N., Nichols, J. W. & Wang. W. X. 1998. Trace elements trophic transfer in aquatic organisms: A critique of the kinetic model

- approach. **The Science of the Total Environment.**, 219: 117-135.
- √Reinfelder, J. R. & Fisher, N. S. 1991. The assimilation of elements ingested by marine copepods. **Science.**, 251: 794-796.
- √Reinfelder, J. R. & Fisher, N. S. 1994. The assimilation of elements ingested by marine planktonic bivalve larvae. **Limnol. Oceanogr.**, 39: 12-20.
- √Reis, A., Gouveia, L. Veloso, V., Fernandes, H. L., Empis, J. A. & Novais, J. M. 1996. Eicosapentaenoic acid-rich biomass production by the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* in a continuous-flow reactor. **Bioresour. Technol.**, 55: 83-88.
- √Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., Øie, G. & Olsen, Y. 1993. Nutritional effects of algal additions in first feeding of turbot (*Scophthalmus máximus* L.) larvae. **Aquaculture.**, 188: 257-275.
- √Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R. & Olsen, Y. 1994. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. **J. Phycol.**, 30: 972-979.
- √Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R. & Olsen, Y. 1994b. Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. **Aquacult. Int.**, 2: 33-48.
- √Reitan, K. J., Rainuzzo, J. R., Øie, G. & Olsen, Y. 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. **Aquaculture.**, 155: 207-221.
- √Renaud, S. M. and Parry, D. L. (1994). Microalgae for use in tropical aquaculture 2: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. **J. Appl. Phycol.** 6 (3): 347-356.
- √Renaud, S. M., Thinh, Luong-Van. & Perry, D. L. 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. **Aquaculture.**, 170: 147-159.
- √Renger, G. & Holzwarth, A. R. 2005. Primary Electron Transfer. In: T. Wydrzynski and K. Satoh (Eds.): *Photosystem II; The Light Driven Water Plastoquinone Oxidoreductase*, Springer, pp. 139-175
- √Rico-Villa, B., Le Coz, J. R., Mingant, C. & Robert, R. 2006. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Aquaculture.**, 256: 377-388.
- √Rider, S. A., Davies, S. J., Jha, A. N., Fisher, A. A., Knight, J. & Sweetman, J. W. 2009. Supra-nutritional dietary intake of selenite and selenium yeast in normal and stressed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Implications on selenium status and health responses. **Aquaculture.**, 295: 282-291.
- √Riisgard, H. V., Nielsen, K. N. & Sogaard-Jensen, B. 1980. Further studies on volume regulation and effects of copper in relation to pH and EDTA in the naked marine flagellate *Dunaliella marina*. **Mar. Biol.**, 56: 267-276.
- √Rijstenbil, J. W., Dehairs, F., Ehrlich, R. & Wijnholds, J. A. 1998. Effect on the nitrogen status on copper accumulation and pools of metal-peptides in the planktonic diatom *Thalassiosira pseudonana*. **Aquatic Toxicology.**, 42: 187-209.

- √Rivero-Rodríguez, S., Beaumont, A. R. & Lora-Vilchis, M. C. 2007. The effect of microalgal diets on growth, biochemical composition, and fatty acid profile of *Crassostrea corteziensis* (Hertlein) juveniles. **Aquaculture.**, 263: 199-210.
- √Robin, J. H. 1995. Effect of diets containing alfa-linolenic acid on n-6 highly unsaturated fatty acid content of rotifer (*Brachionus plicatilis*). **Hydrobiologia.**, 131/314: 185-190.
- √Robin, J. H. 1989. The quality of living preys for fish larval culture: preliminary results on mineral supplementation. In: *Aquaculture, a Biotechnology in Progress* (Ed. By N. de Pawn, E. Jaspers, H. Ackefors & N. Wilkins), pp. 769-774. European Aquaculture Society, Bredene.
- √Rocha de Souza, M. C; Teixeira-Marques, C; Guerra-Dore, C. M; Ferreira da Silva, F. R; Oliveira-Rocha, H. A, & Lisboa-Leite, E. 2007. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from Brown and red seaweeds. **J. Appl. Phycol.** 19: 153-160.
- √Rodríguez, C., Pérez, J. A., Díaz, M., Izquierdo, M. S., Fernandez-Palacios, H. & Lorenzo, A. 1997. Influence of EPA/DHA ratio in rotifers on gilthead seabream (*Sparus aurata*) larval development. **Aquaculture.**, 150: 77-89.
- √Roessler, P. G. (1990). Environmental control of glycerolipid metabolisms in microalgae: commercial implications and future research directions. **J. Phycol.** 26: 393-399.
- √Romanovicz, D. K. 1981. Scale formation in flagellates. En: *Cytomorphogenesis in Plants*. Kiermayer, O. (ed.). Springer-Verlag, Viena, 27-62.
- √Rombaut, G., Dhert, P., Vanderberghe, J., Verschuere, L., Sorgeloos, P. & Verstraete, W. 1999. Selection of bacteria enhancing the growth rate of axenically hatched rotifers (*Brachionus plicatilis*). **Aquaculture.**, 176: 195-207.
- √Ronsón-Paulín, J. A. & Medina Reyna, C. E. 2002. Probióticos en la acuicultura. **Ciencia y Mar.**, 6(18): 45-49.
- √Ronsón-Paulín, J. A. 2003. "Producción de quistes y calidad de nauplios de *Artemia franciscana* Ecotipo Laguna Grande". Tesis de Maestría en Ciencias en Ecología Marina, Universidad del Mar. 105 pp.
- √Ronsón-Paulín, J. A., Otero, A., Dominguez, A., Ferreira, M., Medina-Reyna, C. E. Insua, B., Romero, M. & Fábregas, J. 2004. Modification of the biochemical profile of *Phaeodactylum tricornutum* by means of the minerals incorporation and oligoelements. **European Aquaculture Society, Special Publication.**, 34: 691-692.
- √Ronsón-Paulín, J. A., Santiago-Morales, S, I., Márquez-Rocha, F. J., Martínez-Cruz, M and Córdoba-Alva, F. 2006. " Hemagglutinin activity of microalgae with interest in aquaculture". **World Aquaculture Europe, AQUA 2006, Linking Tradition and Technology. Highest Quality for the Consumer.** May 8-13.
- √Ronsón-Paulín, J. A., Cuevas-Pérez, L. C., Flores-Arvizu, F., Ramírez-Gomez, E., Gómez-Montes, C., Huante-González, Y. & Cruz-Urano, M. L. 2009. Influence of the probiotic *Lactobacillus* in the survival and growth of the *Artemia franciscana*, fed with *Tetraselmis suecica* and *Nannochloropsis* sp. **World Aquaculture Society.**
- √Roo, F. J., Hernández-Cruz, C. M., Socorro, J. A., Fernández-Palacios, H., Montero, D. Izquierdo, M. S. 2009. Effect of DHA content in rotifers on the occurrence of

- skeletal deformities in red porgy *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758). **Aquaculture.**, 287: 84-93.
- √Roque, A. & Gomez-Gil, B. 2003. Therapeutic effects of enrofloxacin in an experimental infection with a luminescent *Vibrio harveyi* in *Artemia franciscana* Kellog 1906. **Aquaculture.**, 220: 37-42.
- √Rosenberry, B. 1997. World Shrimp Farming. **Shrimp News International**, San Diego. 283 p.
- √Rosko, J. J, and Rachlin, J. W. 1977. The effect of cadmium, copper, mercury, zinc and lead on cell division, growth and chlorophyll a content on the chlorophyta *Chlorella vulgaris*. **Bull. Torrey Bot. Club.**, 104: 226-233 pp.
- √Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G. & Hoekstra, W. G. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science.**, 179: 585-590.
- √Roy, S. 1988. Effects of changes in physiological condition on HPLC defined pigment composition of *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin) in batch and turbidostat cultures. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 118: 137-149 pp.
- √Ruttner-Kolisko, A. 1972. "Der Einflu von temperatur und Salzgehalt des Mediums auf Stoffwechselund Vermehrungsinesitt von *Brachionus plicatilis* (Rotatoria)". **Verh. Dtsch. Zool. Ges.**, 65: 89-95.
- √Ruttner-Kolisko, A. 1974. Plankton Rotifers, Biology and Taxonomy. **Biological Station Lunz of the Austrian Academy of Science**. Stuttgart, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. 26(1):1-146 p.
- √Sakamoto, M., Holland, D. L. & Jones, D. A. 1982. Modification of the nutritional composition of *Artemia* by incorporation of polyunsaturated fatty acids using microencapsulated diets. **Aquaculture.**, 28: 311-320.
- √Salisbury, F. B. & Ross, C. W. 1992. *Plant physiol.* Wadsworth Publ. Company. 682 pp.
- √Samson, G., Morissette, J. C. & Popovic, R. 1988. Copper quenching of the variable fluorescence in *Dunaliella tertiolecta*. New evidence for a copper inhibition effect on PS II photochemistry. **Photochem. Photobiol.**, 48: 329-332.
- √Sánchez, S., Martínez, M. E. & Espinola, F. 2000. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. **Biochem. Eng. J.**, 6: 13-18.
- √Saoudi-Helis, L., Dubacq, J. P., Marty, Y., Samain, J. F. & Gudin, C. 1994. Influence of growth rate on pigment and lipid composition of the microalga *Isochrysis* aff. *Galbana* clone T.iso. **J. Appl. Phycol.**, 6: 315-322.
- √Sargent, J. R., Bell, J. G., Henderson, R. J. & Tocher, D. R. 1995. Requirement criteria for essential fatty acids. **J. Appl. Ichtyol.**, 11: 183-198.
- √Sargent, J. R., Bell, M. V. & Tocher, D. R. 1993. Docosahexaenoic acid and the development of brain and retina in marine fish. In: *Omega-3 Fatty Acids: Metabolism and Biological Effects* (Ed) by C. A. Drevon, I. Baksaas & H. E. Krokan), pp. 139-149. Burkhäuser Verlag, Basel.

- √Sargent, J. R. 1995. Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. In: *Broodstock Management and Egg and Larval Quality* (Ed) by N. Bromage & R. Roberts), pp. 353-372. Blackwell Science, Oxford.
- √Sargent, J. R., McEvoy, L. A. & Bell, J. G. 1997. Requirement, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. ***Aquaculture.***, 155: 117-127.
- √Sargent, J. McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J. & Tocher, D. 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. ***Aquaculture.***, 179: 217-229.
- √Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D. & Estévez, A. 1999b. Recent developments in the essential fatty acids nutrition of fish. ***Aquaculture.***, 177: 191-199.
- √Sarma, S. S. S., Larios-Jurado, P. S. & Nandini, S. 2001. Effect of three food types on the population growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera: Brachionidae). ***Rev. Biol. Trop.***, 49: 75-82.
- √Sastre, R. R., CsÖgÖr, Z., Perner-Nochta, Fleck-Schneider, P. & Posten C. 2007. Scale-down of microalgae cultivations in tubular photo-bioreactors-A conceptual approach. ***Journal of Biotechnology.***, 132: 127-133.
- √Sato, M., Takeda, S. & Furuya, K. 2006. Effects of Long-Term Sample Preservation on Flow Cytometric Analysis of Natural Populations of Pico-and Nanophytoplankton. ***Journal of Oceanography.***, 62: 903-908.
- √Sato, N. and Murata, N. 1988. Membrane lipids. *Methods in Enzimology* 167, 251-259.
- √Sato, S. 2003. Minerals. In: Nakagawa, H., Sato, M. (Eds), *Micronutrients and Health of Cultured Fish*. Koseisha-Koseikaku, Tokyo, pp. 22-30.
- √Sayegh, F. A. Q., Radi, N. & Montagnes, D. J. S. 2007. Do strain differences in microalgae alter their relative quality as a food for the rotifer *Brachionus plicatilis*?. ***Aquaculture.***, 273: 665-678.
- √Schanz, F. and Zahler, U. 1981. Prediction of algal growth in batch cultures. ***Schweiz. Z. Hydrobiol.*** 43: 103-113 pp.
- √Schlosser, J. & Anger, K. 1982. The significance of some methodological effects on filtration and ingestion rates of the rotifer *Brachionus plicatilis*. ***Helgoländer Meeresunters.***, 35: 215-225.
- √Schmitt, D., Müller A., Csögör, Z., Frimmel, F. H. & Posten, C. 2001. The adsorption kinetics of metal ions onto different microalgae and siliceous earth. ***Wat. Res.***, 35(3): 779-785.
- √Schuster, I. & Broda, E. 1970. Die Bindung von Zink durch Zellwände von *Chlorella*. ***M Schr. Chem.***, 101: 285-95.
- √Seixas, P., Rey-Méndez, M., Valente, L. M. P. & Otero, A. 2008. Producing juvenile *Artemia* as prey for *Octopus vulgaris* paralarvae with different microalgal species of controlled biochemical composition. ***Aquaculture.***, 283: 83-91.
- √Seixas, P., Coutinho, P., Ferreira, M. & Otero, A. 2009. Nutritional value of the cryptophyte *Rhodomonas lens* for *Artemia* sp. ***J. Exp. Mar. Biol. Ecol.***, Article in Press.
- √Seixas, P., Rey-Méndez, M., Valente, L. M. P. & Otero, A. 2010. High DHA content in *Artemia* is ineffective to improve *Octopus vulgaris* paralarvae rearing. ***Aquaculture.***, 300: 156-162.

- √Serra, M., Gómez, A. and Carmona, M. J. 1998. Ecological genetics of *Brachionus*. **Hydrobiologia** 387/388: 373-384.
- √Serval, M. O., Claire, C., Derrien, A., Coiffard, L. and De-Roeck-Holtzhauer, Y. (1994). Fatty acid composition of some marine microalgae. **Phytochemistry** 36 (3): 691-693.
- √Seto Marine Biology Laboratory. 1966. On the artificial reproduction of read sea bream *Pagrus major*. **Saibaigyogyo**, 3 (3,4): 9-18.
- √Shapiro, H. M. 1988. Practical Flow Cytometry. Alan R. Liss, Inc., New York. 353 pp.
- √Shapiro, H. M. 1990. Cell membrane potential analysis. In: Methods in Cell Biology. Vol. 33. Flow Cytometry. Darzynkiewicz, Z. & Crissman, H. A. (Eds). Academic Press. San Diego, California, USA. Pp: 25-36.
- √Shelbourne, J. E. 1968. " The artificial propagation of marine fish ". In Advances in Marina Biology". F. S. Russel, Ed; 2: 1-83 pp.
- √Sheguineau, C., Laschi-Locquerie, A., Leclerq, M., Samain, J. F. & fayol, V. 1993. Vitamin transfer from algal diet to *Pecten maximus* larvae. **J. Mar. Biotechnol.**, 1: 67-71.
- √Sheguineau, C., Laschi-Locquerie, A., Moal, J. & Samain, J. F. 1996. Vitamin requirements in great scallop larvae. **Aquaculture International**., 4: 315-324.
- √Shelef, G. and Soeder, C. J. 1980. En: "Algae Biomass. Production and Use". **Elsevier-North Holland Biomedical Press**. Amsterdam 852 pp.
- √Shields, R. J. 2001. Larviculture of marine finfish in Europe. **Aquaculture**., 200: 55-88.
- √Shin, P. K. S., Yip, K. M., Xu, W. Z., Wong, W. H. & Cheung, S. G. 2008. Fatty acids as markers to demonstrating trophic relationships among diatoms, rotifers and green-lipped mussels. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 357:75-84.
- √Spolaore, P., Joannis-Cassan , D., Duran , E. & Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. **J. Biosci. Bioeng.**, 101: 87-96.
- √Sick, L. V. 1976. Nutritional effect of five species of marine algae on the growth, development and survival of the brine shrimp *Artemia salina*. **Marine Biology**., 35: 69-78.
- √Sicko-Goad, L. 1982. A morphometric analysis of algal response to low dose, shortterm heavy metal exposure. **Protoplasma**., 110: 75-86.
- √Siron, R., Giusti, G., Berland, B. 1989. Changes in the fatty acid composition of *Phaedactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, 55(1): 95-100.
- √Simkiss, K. 1979. Metal ions in cells. **Endeavour, New Series**., Vol(3), pp. 2-6.
- √Sorgeloos, P. 1979. The brine shrimp *Artemia salina*: a bottleneck in mariculture? En FAO Technical conference on aquaculture. Kioto 1976. (Eds) Pillar, T. V. R. y Wm.A. Dill. Farnham: Fishing news books 321-324 p.
- √Sorgeloos, P., Lavens, P., Leger, P. H., Tackaert, W. & Versichele, D. 1994. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in Aquaculture, FAO.

- √Sorgeloos, P., P. Dhert y P. Candreva. 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* sp., in marine fish larviculture. **Aquaculture**. 200: 147-159.
- √Song T. Y. & Yen. G. C. 2002. Antioxidant Properties of *Antrodia camphorata* in Submerged Culture. **J. Agric. Food Chem.** 50: 3322-3327.
- √Souto, M., Saavedra, M., Pausão-Ferreira, P. & Herrero, C. 2008. Riboflavin enrichment throughout the food chain from the marine microalga *Tetraselmis suecica* to the rotifer *Brachionus plicatilis* and to White Sea Bream (*Diplodus sargus*) and Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) larvae. **Aquaculture**, 283: 128-133.
- √Solbakken, J. S., Berntssen, M. H. G., Norberg, B., Pittman, K. and Hamre. 2002. Different iodine and thyroid hormone levels between Atlantic halibut larvae fed wild zooplankton or *Artemia* from first exogenous feeding until post metamorphosis. *Journal of Fish Biology* 61 (6), 1345-1362.
- √Scott, A. P. and Baynes, S. M. 1978. Effect of algal diet and temperature on the biochemical composition of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. **Aquaculture** 14, 247-260.
- √Shin, P. K. S., Yip, K. M., Xu, W. Z., Wong, W. H. & Cheung, S. G. 2008. Fatty acid as markers to demonstrating trophic relationships among diatoms rotifers and green-lipped mussels. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 357: 75-84.
- √Stauber, J. L, and Florence, T. M. 1987. Mechanisms of toxicity of ion copper and copper complexes to algae. **Mar. Biol.**, 94: 511-519 pp.
- √Stauber, J. L. & Jeffrey, S. W. 1988. Photosynthetic pigments in fifty-one species of marine diatoms. **J. Phycol.**, 24: 158-172.
- √Stauber, J. L, and Florence, T. M. 1990. Mechanisms of toxicity of zinc to the marine diatom *Nitzschia closterium*. **Mar. Biol.**, 105: 519-524 pp.
- √Stauber, J. L. & Davies, C. M. 2000. Use and limitations of microbial bioassays for assessing copper bioavailability in the aquatic environment. **Environ. Rev.**, 8: 255-301.
- √Steffens, W. 1987. Principios fundamentales de la alimentación de los peces. (Ed.) Acribia, S. A. Zaragoza, España.
- √Stokes, P. M., Hutchinson, T. C. & Krauter, K. 1973. Heavy-metal tolerance in algae isolated from contaminated lakes near Sudbury, Ontario smelters. **Can. J. Bot.**, 51: 2155-2168.
- √Støttrup, J. G. & Jensen, J. 1990. Influence of algal diet on feeding and egg production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 141: 87-105.
- √Støttrup, J. G. & Attramadal, Y. 1992. The influence of different rotifer and *Artemia* enrichment diets on growth, survival and pigmentation in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. **J. World Aquaculture Society**, 23(4): 307-316.
- √Støttrup, J. G. & McEvoy, L. A. 2003. Live feeds in marine aquaculture. (Eds.). Blackwell Science Ltd. 318 pp.

- √Sunda, W. G. and Guillard, R. R. L. 1976. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. **J.Mar. Res;** 37: 761-777 pp.
- √Sunda, W. G. & Huntsman, S. A. 1998. Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: phytoplankton as model systems. **Science of the Total Environment.,** 219: 165-181.
- √Sukenik, A. & Wahnon, R. 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. *Isochrysis galbana*. **Aquaculture,** 97: 61-72.
- √Sukenik, A. & Carmeli, Y. 1990. Lipid synthesis and fatty acid composition in *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) growth in a light-dark cycle. **J. Appl. Phycol.,** 26: 463-469.
- √Smith, M. A. 1983. The effect of heavy metals on the cytoplasmic fine structure of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta). **Protoplasma.,** 116: 14-23.
- √Smith, B. C. 1994. Investigating allelopathy between the marine microalgae; some species familiar to aquaculture. *J. Shellfish Res.,* 13: 319-320.
- √Snell, T. W. 1991. Improving the design of mass culture systems for the rotifer *brachionus plicatilis*. In: Fulks W. & K. L. Main (Eds), Rotifer and Microalgae culture systems. Proceedings of a U. S.-Asia Workshop. The Oceanic Institute, Honolulu, Hi: Argent Press. 61-71.
- √Snell, T. W. 1986, Effect of temperature, salinity and food level on sexual and asexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). **Mar. Biol.,** 92: 157-162.
- √Snell, T & Carrillo, K. 1984. Body size variation among strains of the rotifer *Brachiouunus plicatilis*. **Aquaculture.,** 37: 359-367.
- √Snell, T. W., Childress, M. J., Boyer, E. M. & Hoff, F. H. 1987. Assessing the status of rotifer mass culture. **J. World Aquacult. Soc.,** 18: 270-277.
- √Spotte, S. 1979. Culture media In: Seawater aquariums-the captive environment. New Jersey. Wiley, p. 26-54.
- √Swartzman, G. L. 1990. Modeling the effect of algal biomass on mutispecies aquatic microcosms response to copper toxicity. **Aquat. Toxicol;** vol. 17, no. 2, 93-118 pp.
- √Soudant, P., Sanles, M. V., Quére, C. 2000. The use lipids emulsions for sterol supplementation of spat of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Aquaculture,** 184: 315-326.
- √Singleton, V. L; & Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture,* 16: 144-153.
- √Sokal, R. R. y F. J. Rohlf. 1995. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 3rd. Ed. W. H. Freeman and Co. New York, N. Y. USA. 881 p.
- √Soong, Y. T. & Barlow, P. J. 2004. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry.,** 88: 411-417.

- √Snell, T. & Carrillo, K. 1984. Body size variation among strains of the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Aquaculture.**, 37: 359-367.
- √Sun, T. & Ho, C. T. 2005. Antioxidant activities of buckwheat extract. **Food Chem.**, 90: 743-749.
- √Sui, L. Wille, Cheng, M. & Sorgeloos, P. 2007. The effect of dietary n-3 HUFA levels and DHA/EPA ratios on growth, survival and osmotic stress tolerance of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* larvae. **Aquaculture.**, 273: 139-150.
- √Tarchevskii, I. A; Lozavaya, V. V; Gordon, L, and Akhmerova, A. A. 1982. Changes in the synthesis of structural polysaccharides under modification of the plasmalemma with lead nitrate and pipolphen. **Fiziol. Rast.**, 29: 895-900 pp.
- √Takamatsu, S., Hodges, T. W., Rajbhandari, I., Gerwick, W. H., Hamann, M. T. & Nagle, D. G. 2003. Marine natural products as novel antioxidant prototypes. **Journal of Natural Products.**, 66: 605-608.
- √Takeda, S. 1998. Influence of iron availability on nutrient consumption ratio of diatoms in oceanic waters. **Nature.**, 33: 774-777.
- √Takeyama, H., Iwamoto, K., Hata, S., Takano, H. & Matsunaga, T. 1996. DHA enrichment of rotifers: A simple two-step culture using the unicellular algae *Chlorella regularis* and *Isochrysis galbana*. **J. Mar. Biotechnol.**, 3: 244-247.
- √Takeuchi, T., Toyot, M., Watanabe, T. 1992. Comparison of lipid and n-3 highly unsaturated fatty acid incorporations between *Artemia* enriched with various types of oil by direct method. **Nippon Suisan Gakkaishi.**, 58: 277-281.
- √Tamaru, C. S., Lee, C. S. & Ako, H. 1991. Improving the larval rearing of striped mullet (*Mugil chepalus*) by manipulating quantity and quality of the rotifer *Brachionus plicatilis*. In: Fulks W. & K. L. Main (Eds), Rotifer and Microalgae culture systems. Proceedings of a U. S.-Asia Workshop. The Oceanic Institute, Honolulu, Hi: Argent Press. 61-71.
- √Tanaka-Kitatani, Y. Satoh, K. & Katoh, S. 1990. Interactions of Benzoquinones with Q_A^- and Q_B^- in Oxygen-Evolving Photosystem II Particles from the Thermophilic Cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. **Plant and Cell Physiology.**, 31(7): 1039-1047.
- √Tannin-Spitz, T., Bergman, M., van-Moppes, D., Grossman, S. & Arad, S. 2005. Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. **Journal of Applied Phycology.**, 17: 215-222.
- √Teshima, S. & Kanazawa, A. 1974. Biosynthesis of sterols in abalone *Haliotis gurneri* and mussel *Mytilus edulis*. **Comp. Biochem. Physiol.**, B43: 555-561.
- √Teshima, S. T., Kanazawa, A., Horinouchi, K., Yamasaki, S. & Hirata, H. 1987. Phospholipids of the rotifer, prawn and larval fish. **Nippon Suisan Gakkaishi.**, 53: 609-615.
- √Tempest, D. W. 1978. Dynamics of microbial growth. In: "Essays in Microbiology" Norris, J. R. & Richmond, M. H. (Eds.) John Wiley & Sons. Chichester.

- √Terry, K. L., Hirata, J. & Laws, E. A. 1985. Light, nitrogen and phosphorus limited growth of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin strain TFX-1: Chemical composition, carbon partitioning and the diel periodicity of physiological processes. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 86: 85-100.
- √Tocher, D. R. & Sargent, J. R. 1984. Analyses of lipids and fatty acids in ripe roes of some northwest European marine fish. **Lipids.**, 19: 492-499.
- √Tocher, R. D., Bendiksen, E. A., Campbell, P. J. & Bell, J. G. 2008. Review: The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. **Aquaculture.**, 280: 21-34.
- √Tonheim, S. K., Koven, W. & Ronnestad, I. 2000. Enrichment of *Artemia* with free methionine. **Aquaculture.**, 190: 223-235.
- √Thane, A. 1974. Reproduction of marine invertebrates. Vol. I. Ed. Arthur V. Giese and S. Pearse. Academic Press Nueva York and London.
- √Theilacker, G. H. & Kimball, A. S. 1984. Comparative quality of rotifers and copepods as food for larval fishes. **CalCOFI Report.**, 25: 80-86.
- √Thomas, W. H., Seibert, D. L. R., Alden, M., Neroi, A. and Eldridge, P. 1984. Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal culture I. Introduction and *Phaeodactylum tricornutum* experiments. Biomass 5: 181-209.
- √Thomas, W. H; Hollobaugh, J. T, and Selbert, D. L. R. 1980. Effects of heavy metals on the morphology of some marine phytoplankton, **Phycologia.**, 19: 202-209 pp.
- √Thompson, P. A., Harrison, P. J. & Whyte, J. N. C. 1990. Influence of irradiance on the fatty acids composition of phytoplankton. **J. Phycol.**, 26: 278-288.
- √Thompson, P. A., Guo, M. X. & Harrison, P. J. & Whyte, J. N. C. 1992. Effects of variation in temperature . II. On the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. **J. Phycol.**, 28: 488-497.
- √Thompson, P. A., Guo, M. X. & Harrison , P. J.1993. The influence of irradiance on the biochemical composition of three phytoplankton species and their nutritional value for larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Mar Biol.**, 117:259-268.
- √Troussellier, M. G., Courties, C. & Zettelmaier, S. 1995. Flow cytometric analysis of coastal lagoon bacterioplankton and picophytoplankton: Fixation and storage effects. **Estuarine Coastal Shelf. Sci.**, 40: 621-633.
- √Trider, D. J. & Castell, J. D. 1980. Effect of dietary lipids on growth, tissue composition and metabolism of the oyster (*Crassostrea virginica*). **J. Nutr.**, 110: 1303-1309.
- √Tjahjono, A. Hayama, Y., Kakizono, T., Terada, Y., Nishio, N. and Nagai, S. 1994. "Hyper-accumulation of astaxanthin in a green-alga *Haematococcus pluvialis* at elevated-temperatures ". **Biotechnol. Lett.** 16:133-138.
- √Tzovenis, I., De Pauw, N. & Sorgeloos, P. 2003a. Optimization of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids I. Effect of different light regimes on growth and biomass production. **Aquaculture.**, 216: 203-222.

- √Tzovenis, I., De Pauw, N. & Sorgeloos, P. 2003b. Optimization of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids II. Effect of different light regimes on the production of fatty acids. **Aquaculture**, 216: 223-242.
- √Umorin, M. & Lind, O. 2005. Cell volume distribution dynamics of *Chlorella vulgaris* Beij. in batch cultures under continuous light. **Biotechnology Letters**, 27: 347-354.
- √Utting, S. D. 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. **Aquacultural Engineering**, 4: 175-190.
- √Usov, A. I., Velde, F., van de, Knutsen, S. H., Rollem, H. S. & Cerezo, A. S. 2002. ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Trends Foods Sci.**, 13: 73-92.
- √Uye, S. 1981. Fecundity studies of neritic calanoid copepods *Acartia clausi* Giesbrecht and *A. steuri* Smirnov: a simple empirical model of daily egg production. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 50: 255-271.
- √Vaulot, D., Courties, C. & Partensky, F. 1989. A simple method to preserve oceanic phytoplankton for flow cytometry analyses. **Cytometry**, 10: 629-635.
- √Vallee, B. L. & Auld, D. S. 1990. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. **Biochemistry**, 29: 5647-5659.
- √Vadstein, O., Øie, G. & Olsen, O. 1993. Particle size dependent feeding by the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Hydrobiologia**, 255/256: 261-267.
- √Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R. & Núñez-Cabrero, F. 1999. Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. **Aquacultural Engineering**, 20: 135-147.
- √Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R. & Núñez-Cabrero, F. 2002. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll *a* content in *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. **Aquacultural Engineering**, 25: 207-216.
- √Vanitha, A., Narayan, M. S., Murthy, K. N. & Ravishankar, G. A. 2007. Comparative study of lipid composition of two halotolerant alga, *Dunaliella bardawill* and *Dunaliella salina*. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, 58: 373-382.
- √Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. & Oomah, B. D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **J. Agric. Food Chem.**, 46: 4113-4117.
- √Verón, B., Dauguet, J. C. & Billard, C. 1998. Sterol biomarkers in marine phytoplankton. II Free and conjugated sterols of seven species used in mariculture. **J. Phycol.**, 34: 273-279.

- √Versteegh, G. J.M., Riegman, R., de Leeuw, J. W. % Jansen, J. H. F. 2001. U^{K}_{37} values for *Isochrysis galbana* as a function of culture temperature, light intensity and nutrient concentrations. **Organic Geochem.**, 32: 785-794.
- √Villanueva, R. & Bustamante, P. 2006. Composition in essential and non-essential elements of early stages of cephalopods and dietary effects on the elemental profiles of *Octopus vulgaris* paralarvae. **Aquaculture.**, 261: 225-240.
- √Villanueva, R. & Norman, M. D. 2008. Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.**, 46: 105-202.
- √Volkman, J. K., Smith, D. J., and Eglinton, G. 1981. Sterol and fatty acid composition of four marine haptophycean algae. **J. Mar. Biol. Ass. UK.** 61: 509-527 pp.
- √Volkman, J. K., Jeffrey, S. W., Nichols, P. D., Rogers, G. I & Garland, C. D. 1989, Fatty acids and lipids composition of 10 species of microalgae used in mariculture. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 128:219-240.
- √Walne, P. R. 1970. Present problems in the culture of the larvae of *Ostrea edulis*. **Helgoland Marine Research.**, 20(1-4): 514-525.
- √Walker, K. F. 1981. " A synopsis of ecological information on the saline lake rotifer *Brachionus plicatilis* Muller 1786". **Hydrobiologia.**, 81: 159-167.
- √Wallace, R. L. & Snell, T. W. 1991. "Rotifera". In: J. H. Thorp and A. P. Covich (Eds), *Ecology and classification of north American freshwater invertebrates*. Academic Press, NY.
- √Wang, W. X. & Fisher, N. S. 1996. Assimilation of trace elements and carbon by the mussel *Mytilus edulis*: effects of food composition. **Limol. Oceanogr.**, 41: 197-207.
- √Wang, T. C., Weissman, J. C., Ramesh, G., Varadarajan, R & Benemann, J. R. 1998a. Heavy metal binding and removal by *Phormidium*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 60: 739-744.
- √Wang, W.X. & Fisher, N. S. 1998. Accumulation of trace elements in a marine copepod. **Limol. Oceanogr.**, 43: 273-278.
- √Wang, W. X. & Fisher, N. S. 1999a. Delineating metal accumulation pathways for marine invertebrates. **Science of the Total Environment.**, 237/238: 463-464.
- √Wang, W. X. & Fisher, N. S. 1999b. Assimilation efficiency of chemical contaminants in aquatic invertebrates: a synthesis. **Environmental Toxicology and Chemistry.**, 18: 2038-2039.
- √Wang, W. X., Dei, R. C. H. & Xu, Y. 2001. Responses of Zn assimilation by coastal plankton to macronutrients. **Limnology and Oceanography.**, 46: 1524-1543.
- √Wang, W. X. & Dei, R. C. H. 2001a. Effects of major nutrient additions on metal uptake in phytoplankton. **Environmental Pollution.**, 111: 233-240.
- √Wang, W. X. & Dei, R. C. H. 2001b. Metal uptake in a coastal diatom influenced by major nutrients (N, P and Si). **Water Research.**, 35: 315-321.
- √Wang, W. X. & Dei, R. C. H. 2001c. Biological uptake and assimilation of iron by marine plankton: influences of macronutrients. **Marine Chemistry.**, 74: 213-226.

- √Wang, M. H., Wang, D. Z., Wang, G. Z., Huang, X. G. & Hong, H. S. 2007. Influence of N, P additions on the transfer of nickel from phytoplankton to copepods. **Environmetal Pollution.**, 148: 679-687.
- √Wangensteen, H., Samuelsen, A. B. & Malterud, K. E. 2004. Antioxidant activity in extracts from coriander. **Food Chemistry.**, 88: 293-297.
- √Watanabe, T., Kitajima, C. & Fujita, S. 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. **Aquaculture.**, 34: 115-143.
- √Watanabe, T., Izquierdo, M. S., Takeuchi, T., Satoh, S. & Kitajima, C. 1989. Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essentials efficacy in larval red seabream. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 55: 1635-1640.
- √Watanabe, T. & Kiron, V. 1994. Prospects in larval fish dietetics. **Aquaculture.**, 124: 223-251.
- √Watanabe, T., Kiron, V. & Satoh, S. 1997. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture.**, 151: 185-207.
- √Weber, C. I. 1971. A guide to the common diatoms at water pollution surveillance system station. U.S. **Environmetal Protection Agency**.
- Werner, D. 1977. The Biology of Diatoms. Botanical Monographs, Vol. 13. Blackwell Scientific Publications. 498 pp.
- √Weirich, C. R. & Reigh, R. C. 2001. Dietary lipids and stress tolerance of larval of larval fish. In: Webster, C. D., Lim, C. (Eds), Nutrition and Fish Health. Haworth Press, Inc., Binghampton, New York, pp. 301-312.
- √Wood, A. M., Everroad, R. C. and Wingard, L. M. 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures. En: Algal culturing techniques. Andersen, L. A. (Ed.). Elsevier Academic Press, Oxford, 269-286.
- √Wikfors, G. H. 1986. Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. **Aquaculture.**, 59: 1-14.
- √Wikfors, G. H., Patterson, G. W., Ghosh, P., Lewin, R. A., Smith, B. C. & Alix, J. H. 1996. Growth of post-set oysters, *Crassostrea virginica*, high-lipid strains of algal flagellates *Tetraselmis* spp. **Aquaculture.**, 143: 411-419.
- √Williams, R. J. P. 1981. Natural selection of the chemical elements. **Proc. R. Soc.**, B213: 361-397.
- √Wong, C.C., Li, H. B., Cheng, K. W. & Chen, F. 2006. A systematic survey af antioxidant activity of 30 Chinese medicinals plants using the ferric reducing antioxidant power assay. **Food Chemistry.**, 97: 705-711.
- √Wright, S. W., Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C., Llewellyn, C. A., Bjorland, T., Repeta, D, and Welschmeyer, N. 1991. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids form marine phytoplankton. **Mar Ecol. Prog. Ser.** 77: 183-196 pp.
- √Whyte, J, N. C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. **Aquaculture.**, 60: 231-241.

- √Whyte, J. N. C. & Nagata, W. D. 1990. Carbohydrate and fatty acid composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*, fed mono-specific diets of yeast and phytoplankton. **Aquaculture**, 89: 263-268.
- √Wullur, S., Sakakura, Y. & Hagiwara, A. 2009. The minute monogonont rotifer *Proales similis* de Beauchamp: Culture and feeding to small mouth marine fish larvae. **Aquaculture**, 293: 62-67.
- √Xu, Y. & Wang, W. X. 2002. The assimilation of detritus-bound metals by the marine copepod *Acartia spinicauda*. **Limnol. Oceanogr.**, 47: 604-610.
- √Yan, X., Nagata, T. & Fan, X. 1998. Antioxidative activities in some common seaweeds. **Plant. Foods Hum. Nutr.**, 52: 253-262.
- √Yúfera, M., Lubián, L. & Pascual, E. 1983. Efecto de cuatro algas marinas sobre el crecimiento poblacional de dos cepas de *Brachionus plicatilis* (Rotífera: Brachionidae) en cultivo. **Investigación Pesquera** 47: 325-336.
- √Yúfera, M., Parra, G. & Pascual, E. 1997. Energy content of rotifers (*Brachionus plicatilis* and *Brachionus rotundiformis*) in relation to temperature. **Hydrobiologia**, 358: 83-87.
- √Yu-Hung, L. & Shi-Yen, S. 2005. Dietary selenium requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. **Aquaculture**, 250: 356-363.
- √Yu-Hung, L. & Shi-Yen, S. 2007. The effects of dietary selenium on the oxidative stress of grouper *Epinephelus malabaricus*, fed high copper. **Aquaculture**, 267: 38-43.
- √Yu-Hung, L. & Shi-Yen, S. 2009. Mutual sparing of dietary requirements for alpha-tocopherol and selenium in grouper *Epinephelus malabaricus*, fed high copper. **Aquaculture**, 294: 242-245.
- √Yongmanitchai, W, and Ward, O. P. 1992. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid. **Phytochemistry**, 30(9): 2963-2967 pp.
- √Yongmanitchai, W. & Ward, O. P. 1991. Growth and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. **Applied and Environmental Microbiology** 57 (2): 419-425.
- √Ying, L., Kang-sen, M. & Shi-chun, S. 2000. Total lipid and fatty acid composition of eight strains of marine diatoms. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, 18(4): 345-349.
- √Zhang, W. W; Duan, X. J; Huang, H. L; Zhang, Y. & Wang, B. G. 2007. Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphyocladia latiuscula* (Rhodomelaceae). **J. Appl. Phycol.** 19: 97-108.
- √Zhao, X., Xue, C. H., Li, Z. J., Cai, Y. P., Liu, H. Y. & Qi, H. T. 2004. Antioxidant and hepatoprotective activities of low molecular weight sulfated polysaccharide from *Laminaria japonica*. **J. Appl. Phycol.**, 16: 111-115.
- √Zhu, C. J., Lee, Y. K. & Chao, T. M. 1997. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. **J. Appl. Phycol.**, 9: 451-457.

- √Zhukova, N. V., Imbs, A. B. & Yi, L. F. 1998. Diet-induced changes in lipid and fatty acid composition of *Artemia salina*. ***Comparative Biochemical and Physiology Part B.*** 120: 499-506.
- √Zubia, M., Robledo, D. & Freile-Pelegrin, Y. 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatán Península, México. ***J. Appl. Phycol.***, 19: 449-458.